ZUR BEDEUTUNG VON EXOGENEN THIOLEN FÜR DIE INSULINSEKRETION AUS LANGERHANSSCHEN INSELN DER RATTE

Einfluß von GSH, Cystein und Cysteinderivaten auf die durch Glucose und andere Stimulatoren induzierte Freisetzung von Insulin

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE ENZ
aus Illertissen

1984

ZUR BEDEUTUNG VON EXOGENEN THIOLEN FÜR DIE INSULINSEKRETION AUS LANGERHANSSCHEN INSELN DER RATTE

Einfluß von GSH, Cystein und Cysteinderivaten auf die durch Glucose und andere Stimulatoren induzierte Freisetzung von Insulin

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GABRIELE ENZ
aus Illertissen

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Mai 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1981 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im November 1983 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiter gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
C	Celsius
C_o	Zählrate des Nullwerts
C_x	Zählrate von Standard oder Probe
pCMB	p-Chloromercuribenzoat
db-cAMP	Dibutyryl-cAMP
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP-Salz	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(-2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagens
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
f	Verdünnungsfaktor
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
i.p.	intraperitoneal
IRI	immunoreaktives Insulin
i.v.	intravenös
KRB-Puffer	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer
µU	Mikro-units
µM	mikromolar
mmol	Millimol
mM	millimolar

min	Minuten
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant
p	probability
PPS	Pentosephosphatshunt
r	Korrelationskoeffizient
Ria	Radioimmunoassay
SEM	standard error of the mean
U	units

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Stand der Forschung	1
1.1.1.	Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion - Zusammenfassende Darstellung	1
1.1.2.	Rolle der Thiole im Mechanismus der Insulinsekretion	7
1.1.3.	Bedeutung von GSH in der Zelle	12
1.1.4.	Bedeutung von Cystein in der Zelle	15
1.2.	Fragestellung	18
2.	MATERIAL	23
2.1.	Versuchstiere	23
2.2.	Geräte	24
2.3.	Chemikalien	25
2.4.	Nähr- und Reagenzlösungen	26
2.4.1.	Hanks' Lösung	26
2.4.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB-Puffer)	27
2.4.3.	Puffer für Ratteninsulinlösung	28
2.4.4.	Lösungen für die Bestimmung des Gesamtthiolgehalts	28
2.4.5.	Herstellung der Inkubationslösung von Ca-Ionophor A-23187	29
3.	METHODEN	30
3.1.	Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovski (1967)	30

3.1.1.	Operation	30
3.1.2.	Isolierung der Langerhansschen Inseln	30
3.2.	Vorinkubation	32
3.3.	Hauptinkubation	32
3.3.1.	Hauptinkubation bei den Versuchen zur Untersuchung der Bedeutung von GSH für die Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte bei Verwendung verschiedener Stimulatoren	32
3.3.2.	Hauptinkubation bei Versuchen zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Thiolen auf die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte	39
3.3.2.1.	Erstellung einer verbesserten Versuchsanordnung	39
3.3.2.1.1.	Netzgefäße	39
3.3.2.1.2.	Halterung	40
3.3.2.2.	Durchführung der Hauptinkubation	41
3.3.2.3.	Einfluß der Vorbehandlung der Langerhansschen Inseln der Ratte auf die Steigerung der durch Glucose (11,1 mM) stimulierten Insulinsekretion durch Thiole	43
3.3.3.	Vergleich der unter 3.3.1. und 3.3.2. beschriebenen Methoden	45
3.4.	Insulinbestimmung	48
3.4.1.	Durchführung	48
3.4.2.	Berechnung der Insulinwerte	49
3.4.3.	Einfluß von Thiolen auf den Radioimmunoassay des Insulins	50
3.5.	Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium	57

3.5.1.	Durchführung	57
3.5.2.	Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium bei 0°C in Abhängigkeit von der Zeit	58
3.5.3.	Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit	58
3.5.3.1.	GSH (0,1 mM)	58
3.5.3.2.	Cystein (5 mM)	59
3.5.3.3.	Cysteamin-HCl (1 mM, 5 mM, 10 mM)	59
3.5.3.4.	D-Penicillamin (0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM)	59
3.5.3.5.	N-Acetyl-D-Penicillamin	59
3.5.3.6.	Vergleich der Thiole bezüglich ihrer Stabilität	60
4.	VERSUCHSERGEBNISSE	71
4.1.	Bedeutung von GSH für die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte bei Verwendung verschiedener Stimulatoren	71
4.1.1.	Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Glucose, Ca-Ionophor A-23187 und Glibenclamid induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte	71
4.1.1.1.	Glucose	71
4.1.1.2.	Glibenclamid	71
4.1.1.3.	Ca-Ionophor A-23187	72
4.1.2.	Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Ca-Ionophor A-23187, Glibenclamid, Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte	75
4.1.2.1.	Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf	

die durch Ca-Ionophor A-23187 induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 75

4.1.2.2. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Glibenclamid plus Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 75

4.1.2.3. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Glucagon induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 77

4.1.2.4. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Isoprenalin und db-cAMP induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 79

4.2. Einfluß von L-Cystein und Cysteinderivaten auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 82

4.2.1. Einfluß von verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 82

4.2.2. Einfluß von verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 85

4.2.3. Einfluß von verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 88

4.2.4. Einfluß von verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 91

4.3. Einfluß von Disulfiden auf die durch Glucose indu-

zierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte 94

5. DISKUSSION 97

5.1. Thiolabhängige und thiolunabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion 97

5.1.1. Ca-Ionophor 97

5.1.2. Sulfonylharnstoffe 98

5.1.2.1. Allgemeine Darstellung zum Wirkungsmechanismus 98

5.1.2.2. Thiolabhängigkeit der durch Sulfonylharnstoffe induzierten Insulinsekretion 102

5.1.3. Glucagon, Dibutyryl-cAMP, Isoprenalin 103

5.1.4. Folgerungen 110

5.2. Einfluß von Cystein und Cysteinderivaten auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion 111

5.2.1. Erhöhung des intrazellulären Thiolgehalts 111

5.2.1.1. Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes 111

5.2.1.1.1. Direkte Zufuhr von GSH 114

5.2.1.1.2. Beeinflussung der GSH-Biosynthese durch Zufuhr von Biosynthesepräcursoren 116

5.2.1.1.3. Freisetzung von GSH aus proteingebundenen Speichern 119

5.2.1.2. Direkte Wirkung von Thiolen als SH-Spender 121

5.2.1.3. Folgerungen 121

5.2.2. Einfluß der strukturellen Veränderungen auf die Stabilität und Reaktivität der verwendeten Thiole 123

5.2.3. Pharmakologische Anwendung der untersuchten Thiole 124

5.2.4. Einfluß von Cystein, Cysteamin, D-Penicillamin und

	N-Acetyl-D-Penicillamin auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion	125
5.2.4.1.	Cystein	125
5.2.4.2.	Cysteamin	128
5.2.4.3.	D-Penicillamin	131
5.2.4.4.	N-Acetyl-D-Penicillamin	132
5.2.5.	Einfluß der Disulfide: Cystin, Cystamin, D-Penicillamin-disulfid auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion	135
6.	ZUSAMMENFASSUNG	137
6.1.	Fragestellung	137
6.2.	Versuchsergebnisse	138
6.3.	Schlußfolgerungen	140
7.	LITERATURVERZEICHNIS	142

1. EINLEITUNG

1.1. Stand der Forschung

1.1.1. Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion - Zusammenfassende Darstellung

Basis der Forschung über den Mechanismus der Insulinsekretion ist heute weitgehend die Annahme, daß die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose auf die B-Zelle über ihren Metabolismus zustande kommt, obwohl nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß eine direkte Rezeptorwirkung ebenfalls eine Rolle spielt. Eine Zusammenfassung der wichtigsten metabolischen und ionischen Vorgänge, welche letzlich zur Exocytose führen, ist von Ashcroft 1980 schematisch folgendermaßen dargestellt worden:

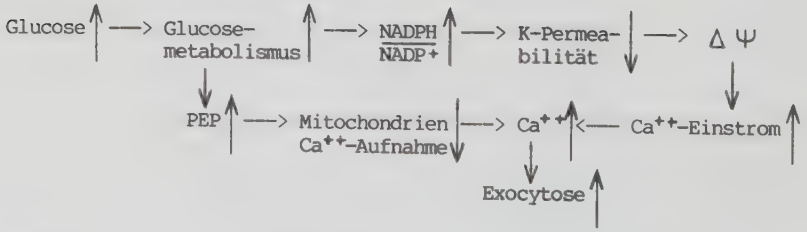


Abb.1.1:

Darstellung der am Sekretionsprozeß beteiligten Stoffwechselvorgänge nach Ashcroft, 1980
Erklärung s. Text

Wichtige Erkenntnisse über die Abhängigkeit der Insulinsekretion vom Glucosemetabolismus lieferten Untersuchungen mit metabolisierbaren und nicht metabolisierbaren Zuckern (Grodsky & al., 1963; Coore & Randle,

1964; Hellerström, 1967; Ashcroft & al., 1970), Hemmstoffen der Glycolyse, z.B. Mannoheptulose (Malaisse & al., 1968; Ashcroft & al., 1973; Ashcroft & Randle, 1975; Zawalich & al., 1977) Glycolysemetaboliten (Dean & Matthews, 1972; Hellman & al., 1974; Malaisse & al., 1974, 1976) und einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese, 6-Aminonicotinamid (Ammon & Steinke, 1972a). Eine Vielzahl von Befunden ergab, daß die Glucose metabolisiert werden muß, um die Sekretion und Biosynthese des Insulins zu stimulieren.

Hinweise auf die Bedeutung des Calciums lieferten Beobachtungen, daß die Insulinsekretion durch Glucose und andere Stimulatoren die Anwesenheit von extrazellulären Ca(2+)-Ionen voraussetzt (Grodsky & al., 1966; Milner & Hales, 1967). Curry zeigte (1968), daß die Insulinsekretion auf einen Glucosestimulus in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca(2+)-Konzentation (0,25 - 2,5 mM) quantitativ zunimmt; Hemmstoffe des Ca(2+)-Influx wie Co(2+) und Ni(2+) (Henquin & Lambert 1974, 1975; Dormer & al., 1974) und D 600 (Henquin, 1978b) erzielten eine Abnahme der Sekretion. Daß Glucose konzentrationsabhängig zu einer Zunahme des intrazellulären Ca(2+) durch Aufnahme aus dem Extrazellulärraum führt, haben Malaisse und Mitarbeiter gefunden (1971). Mannoheptulose, Hemmstoff der Glycolyse, erniedrigt die 45Ca(2+)-Aufnahme; Glycolysedurchflußrate, Insulinsekretion und 45Ca(2+)-Aufnahme sind gekoppelt. Auch eine Hemmung des Ca(2+)-Efflux wurde gemessen und als ein Mechanismus zur Anreicherung von zellulärem Calcium gedeutet (Malaisse, 1973a).

Beide Wege des Glucoseabbaus, Glycolyse und PPS, führen zu einer Steigerung der cytosolischen Ca(2+)-Konzentration. Beim glycolytischen Abbauweg wird vermutet, daß Phosphoenolpyruvat das Bindeglied zwischen Glucosemetabolismus und cytosolischem Ca(2+)-Anstieg darstellt.

Allerdings ist dabei nicht ein vermehrter Einstrom aus dem Extrazellulärraum, sondern die Hemmung der mitochondrialen Ca(2+)-Aufnahme aus dem Cytosol verantwortlich (Sugden & Ashcroft, 1977, 1978).

Der Metabolismus der Glucose über den Pentosephosphatweg ist in Langerhansschen Inseln aktiv (Jarrett & Keen, 1966; Ammon & Steinke, 1972a). Panten & al. fanden 1973 bei Stimulation mit Glucose, 1974 bei Stimulation mit Leucin und alpha-Ketocapronsäure einen Anstieg der Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide. Messungen der PPS-Aktivität in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration ergaben eine Zunahme der Aktivität von 2,3 % auf 3,2 % und 9,4 % bei 5,6 mM, 11,1 mM und 16,7 mM Glucose und unterstrichen die Bedeutung des PPS bei Glucosemetabolismus und Insulinsekretion (Verspohl & al., 1979). Eine Senkung des NADPH/NADP-Quotienten mit Methylenblau ging einher mit einer Verminderung der Insulinsekretion (Ammon & Verspohl, 1979). Bei Glucosestimulation erniedrigten NH4(+) (Sener & al., 1978) und Menadion (Malaisse & al., 1978) den Gehalt von NADH und NADPH in der Insel. Damit korreliert die Abnahme der Insulinsekretion. Diese Befunde lassen auf die Bedeutung des PPS bzw. des NAPH/NADP-Quotienten bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion schließen.

Eine Verbindung zwischen dem Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten und Erhöhung des cytosolischen Calciums konnte durch Membranpotentialuntersuchungen hergestellt werden. Dean und Matthews berichteten (1968, 1970), daß bei Messungen des Membranpotentials der B-Zelle mit Mikroelektroden Glucose und Tolbutamid eine Depolarisation erzeugen. Weitere Studien von Meissner und Schmelz (1974) verdeutlichten mit einer verfeinerten Methode die elektrische Aktivität der B-Zelle in Abhängigkeit von verschiedenen Glucosekonzentrationen. Die Frage, welche Ionen für die Entstehung der Depolarisation verantwortlich sind, wurde

von Sehlin und Täljedal verfolgt, die 1974 (a+b) fanden, daß die Stimulation der Insulinsekretion mit Glucose nicht mit einer Änderung der 22Na-Aufnahme oder des 22Na-Effluxes einhergeht. Sie zeigten dagegen 1975, daß die durch Glucose ausgelöste Depolarisation mit einer Hemmung der K(+)-Permeabilität verbunden ist. Die verminderte Kaliumpermeabilität löst den Calciuminflux durch einen potentialabhängigen Calciumkanal aus, wie elektrophysiologische und Rb-Fluxmessungen von Henquin (1977, 1978a), Henquin & Meissner (1978) und Meissner (1976) ergaben. Untersuchungen mit verschiedenen Zuckern, Glycolysezwischenprodukten bzw. -hemmstoffen und Stoffen, welche den NAD(P)H-, GSH- oder ATP-Gehalt veränderten, ließen den Einfluß des Glucosemetabolismus auf die K(+)-Permeabilität erkennen (Henquin, 1980a). Es wird dabei die Vermutung geäußert, daß der Metabolismus des Stimulators für die Änderung der Kaliumpermeabilität notwendig ist und der Wirkungsmechanismus zumindest zum Teil über die Erhöhung reduzierter Pyridinnukleotide, eventuell auch des GSH verläuft.

Ein weiterer Weg zur Erhöhung des cytosolischen Calciums verläuft über cAMP. Charles & al. (1973) und andere fanden durch Glucose einen Anstieg des cAMP, welcher durch eine Stimulation der Adenylatcyclase durch das über den potentialabhängigen Calciumkanal eingeströmte Ca(2+) erklärt werden kann (Valverde & al., 1979; Sharp & al., 1980). cAMP beeinflußt die Verteilung des intrazellulären Ca(2+) in der B-Zelle durch Hemmung der Aufnahme von cytosolischem Ca(2+) in Organellen oder Rückverteilung von dort gebundenem Ca(2+) (Brisson & al., 1972). Nach Hahn & al. (1980) hemmt ein erhöhter cAMP-Spiegel eher die Aufnahme in Mitochondrien, als daß es den Efflux aus Mitochondrien steigert.

Neue Erkenntnisse über den weiteren Mechanismus der Insulinsekretion

nach der Akkumulation des Calciums im Cytosol wurden durch die Isolierung des Calmodulins (calcium-dependent regulatory protein) aus Langerhansschen Inseln von Ratten und Kaninchen ermöglicht (Sugden & al., 1979; Bartlett & al., 1980). Da einige Neuroleptica, speziell Trifluoperazin, reversibel an das Protein binden und seine Funktion hemmen (Weiss & al., 1980), konnte die Bedeutung des Calmodulins im Insulinsekretionsmechanismus untersucht werden. Die Inaktivierung des Calmodulins mit Trifluoperazin geht einher mit einer Hemmung der durch Glucose und andere Stimulatoren induzierten Insulinsekretion in vitro (Sugden & al., 1979; Schubart & al. 1980; Krausz & al., 1980). Henquin fand (1981), daß Trifluoperazin keinen Einfluß auf Glucosemetabolismus, cAMP-Gehalt, glucoseabhängigen Ca(2+)-Influx oder Rb-Efflux und Nettoaufnahme hat. Es wird dadurch bestätigt, daß die Substanz ihre Wirkung auf die Insulinsekretion nicht durch Eingriff in metabolische oder ionische Vorgänge ausübt und Calmodulin demnach an einem späteren Punkt der Reaktionskette eingreift.

Von Calmodulin wird angenommen, daß es nach Komplexbildung mit Ca(2+) die Exocytose über das Mikrotubulus-Mikrofilament-System vermittelt. Von Lacy & al. wurde schon 1968 postuliert, daß das Mikrotubulus-Mikrofilament-System an der Bewegung der Sekretionsgranula zur Plasmamembran beteiligt ist. Stoffe, welche dieses System stören, verändern auch die Insulinsekretion: Colchicin hemmt durch Angriff an den Mikrotubuli (Lacy & al., 1968), Cytochalasin B steigert durch Wechselwirkung mit dem Mikrofilament-System (Lacy & al., 1973) die Sekretion von Insulin nach Glucosestimulus.

Drei für die Funktion des Mikrotubulus-Mikrofilament-System wichtige Proteine wurden auf ihre Bedeutung in der Insulinsekretion untersucht: Tubulin, Actin und Myosin.

Montague zeigte (1976), daß durch die Stimulation der Insulinsekretion die Tubulinuntereinheit quantitativ abnimmt, die Mikrotubulibildung aber durch Polymerisation der Untereinheit zunimmt. Dabei wird die Beteiligung der an anderen Geweben beobachteten Wirkung der cAMP-abhängigen Proteinkinase auf das MAP = microtubule-assoziated protein (Sandoval & al., 1976) oder die Mitwirkung des Ca(2+)-Calmodulinkomplexes vermutet.

Actin liegt in Langerhansschen Inseln in globulärer und filamentöser Form vor, wobei die Anwesenheit eines Proteins, welches globuläres Protein vor der Polymerisation schützt, angenommen werden muß. Während der stimulierten Insulinsekretion erhöht sich der Gehalt des polymerisierten Actins, der Vorgang ist aber Ca(2+)-unabhängig und vermutlich eine Folgereaktion der Exocytose (Howell & Tyhurst, 1980).

In-vitro-Studien haben ergeben, daß Granula an Actomyosin, nicht aber an Myosin binden (Howell & Tyhurst, 1981). Wie aus anderen Geweben bereits bekannt (Yagi & al., 1978), wird vom Myosin der Insel angenommen, daß eine Aktivierung der Myosin-light-chain-Kinase durch Ca(2+)-Calmodulin zur Phosphorylierung der Myosin-light-chain führt. Die Phosphorylierung des Myosins ist eine wichtige Voraussetzung für die Mikrofilament-Kontraktion (Adelstein & Eisenberg, 1980).

In diesem Sinne fassen Howell & Tyhurst (1982) die zellulären Vorgänge zwischen Ca(2+)-Akkumulation und Exocytose zusammen:

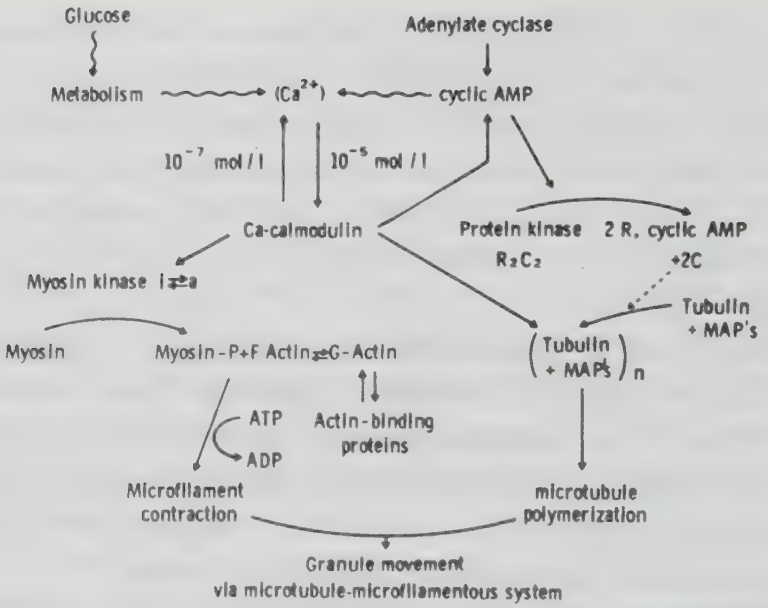


Abb.1.2:

Zusammenhang zwischen Ca(2+), Calmodulin, Mikrotubulus-Mikrofilament-System und Exocytose (Howell & Tyhurst, 1982):
1) Ca(2+) bindet an Calmodulin, der Komplex fördert neben der cAMP-abhängigen Proteinkinase die Polymerisation des Tubulins zu Mikrotubuli.
2) Ca(2+)-Calmodulin aktiviert die Myosinkinase und ermöglicht damit die Mikrofilament-Kontraktion. Entlang des Mikrotubulus-Mikrofilament-Systems bewegen sich die Granula zur Plasmamembran, wo die Exocytose stattfindet.

1.1.2. Rolle der Thiole im Mechanismus der Insulinsekretion

Die Bedeutung des NADPH, welches wohl zum großen Teil durch den Glucosemetabolismus über den PPS entsteht, ist bereits erwähnt worden. 1972 wurde von Ammon und Steinke nach der Beobachtung, daß die durch

den Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese, 6-AN, gestörte Insulinsekretion durch NADH- und NADPH-Zusatz normalisiert werden kann, vermutet, daß die Funktion des NADPH-Anstiegs im Insulinsekretionsmechanismus darin besteht, GSH in reduzierter Form zu erhalten, welches seinerseits die Membraneigenschaften der B-Zelle beeinflußt. Die Reduktion von GSSG zu GSH wird von der Glutathionreduktase katalysiert (Agren & al., 1978).

Wie von mehreren Autoren ein Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten durch Stimulation mit Glucose gefunden wurde (Ammon, 1975; Verspohl & al., 1979; Ashcroft & Christie, 1979; Malaisse & al., 1978), konnten Ammon & al. (1980) eine Zunahme des GSH/GSSG-Quotienten in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration nachweisen. Exogenes Insulin dagegen erniedrigte den GSH-Gehalt der B-Zelle bei niedriger und hoher Glucose und hemmte die Insulinsekretion nach Stimulation mit pCMB und Tolbutamid. Diese Wirkungen des exogenen Insulins stehen in Einklang mit früheren Befunden, wonach der NADPH/NADP-Quotient, die Glucoseoxidation über den PPS und die Insulinsekretion durch exogenes Insulin in einem feedback-Mechanismus konzentrationsabhängig vermindert werden (Ammon & Verspohl, 1976). Methylenblau, ein NADPH-Oxidans (Sass & al., 1969), Diamid, ein membrangängiges GSH-Oxidans (Kosower & al., 1969, 1972) und t-BHP, ein Substrat der Glutathionperoxidase (Sies & al., 1972, Srivastava & al., 1974) verminderten den GSH-Gehalt in der B-Zelle, senkten den GSH/GSSG-Quotienten und die Insulinsekretion nach Stimulation mit Tolbutamid beim perfundierten Pankreas, mit Glucose plus Tolbutamid in isolierten Inseln (Ammon & al., 1979a), sowie nach Stimulation mit pCMB beim perfundierten Pankreas (Ammon & al., 1977) und Leucin plus Glucose (Ammon & al., 1979b) bei isolierten Inseln.

Von einer Vielzahl von Substanzen, welche mit Thiolgruppen auf der

B-Zellmembran reagieren können, z.B. Jodoacetat, Jodoacetamid (Hellman & al., 1973a; Pagliara & al., 1975), organische Quecksilberverbindungen (Bloom & al., 1972), Disulfide (Hellman & al., 1973b), Ethacrynsäure (Landgraf-Leurs & al., 1978) wurde berichtet, daß sie die Insulinsekretion beeinflussen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen intrazellulärem NADPH, GSH und Membraneigenschaften, wie er von Ammon & Steinke (1972a) vermutet wurde, gewann Unterstützung durch Untersuchungen mit organischen Quecksilberverbindungen, welche die Plasmamembran nur langsam permeieren. p-Chloromercuribenzoat (pCMB) stimuliert rasch die Insulinsekretion vermutlich durch Reaktion mit extrazellulären Membranthiolen (Bloom & al., 1972), diese Wirkung ist aber gleichzeitig vom intrazellulären NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotienten abhängig, wie aus der Hemmung der pCMB-induzierten Insulinsekretion durch Methylenblau, Diamid und t-BHP (Ammon & al., 1977) und exogenes Insulin (Ammon & al., 1980) gefolgert werden kann.

Von Hellman wurde 1974 vorgeschlagen, daß Ionenbewegungen durch die Membran von membranständigen Thiolgruppen abhängen. Hellman & al. (1975a) und Erlichman & al. (1979) fanden eine Korrelation zwischen gesteigerter Insulinsekretion und Calciumaufnahme bei pCMB-Stimulation. DIP (Diazodicarbonsäure-N'-methylpiperazid), ein membrangängiges Thioloxidans und dessen nicht membrangängiges Salz ermöglichen eine Unterscheidung zwischen der Oxidation intrazellulärer und extrazellulärer Thiole (Kosower & al., 1974, 1976). DIP hemmt sowohl die Ca(2+)-Aufnahme wie die Insulinsekretion bei 20 mM Glucose. DIP-Salz dagegen steigert beide Parameter. DIP hemmt die Wirkung von DIP-Salz (Ammon & al., 1983). Die durch Glucose ausgelöste Rubidiumeffluxhemmung wird durch DIP allerdings nur geringfügig vermindert (Wahl,

1983). Dieser Befund steht zwar im Einklang mit denen von Henquin (1980a) mit Methylenblau und t-BHP, läßt aber aus quantitativen Erwägungen vermuten, daß Thiole bei der Rubidiumeffluxhemmung keine große Rolle spielt.

Ein weiterer Schritt in der Aufklärung der Rolle von Thiolen im Insulinsekretionsmechanismus wurde durch exogen zugeführte Thiole begonnen. Hellman fand 1975 (b), daß 0,1 mM GSH, Thio-D-Glucose und dextrangebundenes Cystein die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion steigern. Die Dosis-Wirkungskurve von GSH bei der Insulinsekretion ließ erkennen, daß bei 0,1 mM GSH das Maximum der Steigerung der Insulinsekretion erreicht ist (Ammon & al., 1984a). Beim perfundierten Pankreas der Ratte konnte mit GSH und Cystein eine Steigerung der durch Glucose, Tolbutamid und Glucose plus Tolbutamid stimulierten Insulinsekretion gezeigt werden (Ammon & Abdel Hamid, 1981). Exogenes GSH (0,4 mM) erhöht außerdem den durch Glucose verursachten Anstieg des cAMP, wogegen Diamid die Erhöhung des cAMP-Spiegels nach Glucose und pCMB-Stimulation, nicht aber nach Aminophyllin-Zusatz hemmt; die Aktivität der Phosphodiesterase bleibt unbeeinflußt (Ammon & al., 1982).

Während Henquin (1980a) durch GSH, allerdings in hoher Konzentration (10 mM) in Abwesenheit von Glucose eine Hemmung des Rb-Efflux messen konnte, wurde in unserem Labor kein Einfluß auf den Rb-Efflux durch 0,1 mM GSH gefunden (Wahl, 1983).

Betrachtet man intrazelluläres GSH als Vermittler zwischen Glucosemetabolismus bzw. NADPH-Anstieg und Membranthiolen, so liegt der Schluß nahe, daß seine Funktion - wie an anderen Geweben gefunden (Rink & al., 1974, Isaaks & Binkley, 1977) - darin besteht, Membranthiole durch Thiol-Disulfid-Austausch in reduziertem Status zu halten.

Als Zusammenfassung dieser Befunde hat Ammon (1980) vorgeschlagen, daß der Redoxstatus von NADPH/NADP und GSH/GSSG einen modulierenden Einfluß auf die Insulinsekretion hat. Eine Erhöhung der Reduktionsäquivalente sensibilisiert die B-Zelle gegen Stimulatoren der Insulinsekretion, deren Verbrauch hemmt die Sekretionsleistung der B-Zelle:

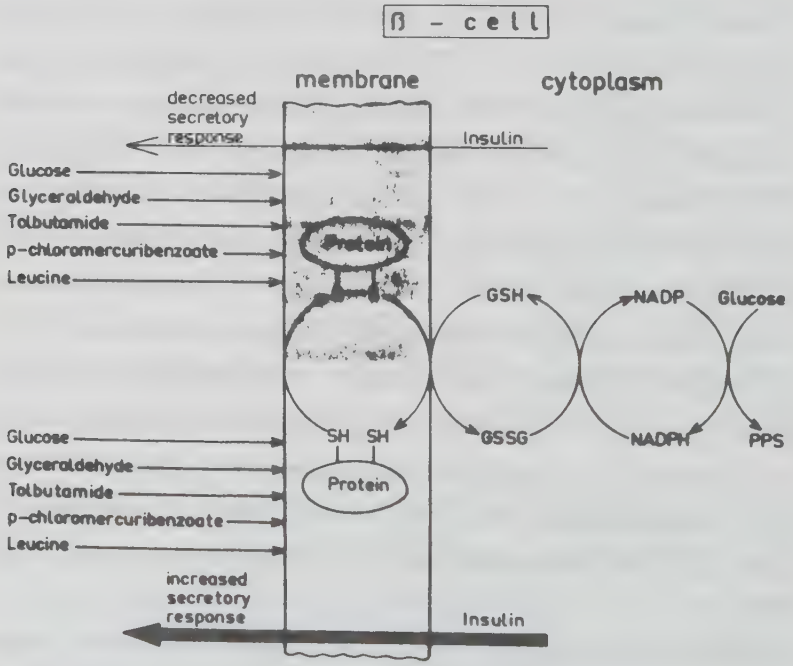


Abb.1.3:

Schematische Darstellung der Bedeutung der B-Zellmembranthiole bei der Regulation der Insulinsekretion. Die Sekretionsantwort auf einen Stimulus ist abhängig vom Redoxstatus der Membranthiole. Als Mechanismus der Reduktion von Membranthiolen wird folgende Reaktionskette angenommen: Oxidation der Glucose über den Pentosephosphat Shunt ---> NADPH ---> GSH ---> Reduktion von Membrandisulfiden (Ammon & al., 1980).

1.1.3. Bedeutung von GSH in der Zelle

Glutathion ist in der Zelle an Vorgängen des Metabolismus, des Transports, der Enzymfunktion und des Zellschutzes beteiligt.

Im Laufe der Evolution wurde durch den Übergang von einer reduzierenden zu einer oxidierenden Atmosphäre ein System für die Zelle dringlich, welches die Aufrechterhaltung eines reduzierten Zellmilieus gegen oxidative Umweltbedingungen ermöglichte (Fahey, 1977). Diesen Schutz gewährleistet das Redoxsystem GSH/GSSG. Wichtigste Reaktionspartner sind Disulfide, Peroxide und Radikale.

Zur Aufrechterhaltung von SH-Gruppen bei niedermolekularen Substanzen (Racker, 1955; Nagai & Black, 1968) oder Proteinen (Mannervik & Eriksson, 1974) dienen Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen mit GSH unter Katalyse von Thioltransferasen (Mannervik & Axelson, 1978, 1980). Interessant in diesem Zusammenhang sind Befunde von Kosower & al. (1982), der durch Fluoreszenzmarkierung der Membranthiole in Erythrozyten mit Glucose-6-phosphatdehydrogenasemangel nachweisen konnte, daß durch Verminderung des intrazellulären GSH mit Diamid Membranthiole oxidiert werden, GSH-Zusatz dagegen Disulfide an isolierten Membranen reduzieren kann. Dies ist als weiterer Hinweis zu werten, daß eine direkte Beziehung zwischen Membranthiolen und intrazellulärem GSH besteht.

Intrazellulär anfallendes H202 wird hauptsächlich von der Glutathionperoxidase unter Verbrauch von GSH beseitigt. Auch organische Peroxide werden auf diesem Wege reduziert (Flohé & Günzler, 1974; Meister, 1975). GSH scheint auch die Lipidperoxidation in Rattenleber zu verhindern bzw. rückgängig zu machen (Christophersen, 1968), Diamid beschleunigt die Lipidperoxidbildung in Mitochondrien der Leber (Bindoli

& al., 1977). In engem Zusammenhang mit der Rolle des GSH beim Schutz der Zelle vor Peroxiden bzw. Sauerstoff steht seine Funktion beim Strahlenschutz (Rink, 1974; Kosower & Kosower, 1974). Zahlreiche Autoren berichten, daß die Empfindlichkeit der Zelle gegen Strahlung vom intrazellulären Thiolgehalt abhängt. Als Wirkungsmechanismus wird die Bindung von Radikalen durch GSH und dessen Schutz vor Peroxidbildung vermutet (Flohé & Günzler, 1976).

Durch solche Schutzreaktionen verbrauchtes GSH wird durch die Glutathionreduktase in Kopplung an NADPH-liefernde Prozesse regeneriert.

GSH reagiert mit einer Vielzahl von Substanzen unter GSH-Konjugatbildung (Chasseaud, 1979) in spontaner Reaktion oder katalysiert durch GSH-S-Transferasen. Solche Konjugate werden ausgeschieden oder in Mercaptursäuren umgewandelt. Die Möglichkeiten der GSH-Konjugatabbauwege sind vielfältig und dienen zur Entgiftung der Zelle.

Der Metabolismus des Glutathions in der Zelle wurde von Meister (1973) durch den gamma-Glutamylzyklus beschrieben, als dessen Funktion er den Transport von Aminosäuren durch die Zellmembran betrachtet. Dabei tritt GSH durch die Zellmembran. Dort wird unter Katalyse der membranständigen gamma-Glutamyltranspeptidase der gamma-Glutamylrest auf eine Aminosäure übertragen. Nach Aufnahme in die Zelle wird die Aminosäure durch die Cyclotransferase freigesetzt. Ob dieses Transportsystem in allen Geweben und für alle Aminosäuren gilt, ist nicht sicher (Meister & Tate, 1976).

Es gibt Hinweise, daß exogen zugeführtes GSH den Hexosetransport beeinflußt. So konnte durch Zufuhr von Thiolen (GSH, Cystein, Dithiothreitol) der Efflux von 3-O-(14C)Methyl-D-Glucose in Rattenthymozyten 3-4 -fach gesteigert, durch Katalase, H_2O_2 und NEM gehemmt werden (Regen & al., 1981). Diese Befunde werden im Zusammenhang mit denen

bei Adipozyten (Czech, 1976) diskutiert, und sollen bestätigen, daß die SH-Oxidation eine Rolle im Glucosetranportmechanismus spielt.

Barron schlug 1951 vor, daß SH-haltige Enzyme durch GSH aktiviert werden können. Eine Vielzahl von Enzymen ist seither auf Thiolgruppen und deren Reaktivität untersucht worden. Eine direkte Beziehung zwischen der basalen und hormonstimulierten Enzymaktivität der Adenylatcyclase in Rattenadipozyten und dem zellulären Redoxpotential bzw. GSH-Gehalt ist von Mukherjee & Lynn (1979) beschrieben worden. Gilbert (1982) diskutiert das Thiol/Disulfidsystem als "third messenger", da er eine Abhängigkeit der Schlüsselenzyme der Glycolyse und Gluconeogenese vom Redoxstatus GSH/GSSG der Kaninchenmuskelzelle als mögliche Modulation dieser Stoffwechselwege erkannt hat.

Neuere Berichte lassen einen Zusammenhang zwischen GSH und der Ca(2+)-Homöostase vermuten. Es wurde beobachtet, daß Bromobenzene zur Schädigung der Membranen in isolierten Hepatozyten führt, indem es sowohl GSH- wie extramitochondrialen Ca(2+)-Verlust verursacht. Wurden die Hepatozyten mit Dicoumarol, Menadion oder t-Butylhydroperoxid inkubiert, traten gleichzeitig intrazellulärer GSH-, extramitochondrialer Ca(2+)-Verlust und Membranschäden auf. Dithiothreitol konnte trotz t-BHP-Exposition sowohl Ca(2+)-Verlust als auch Membranschädigung verhindern (Jewell & al., 1982; Orrenius & al., 1983). Extramitochondriales Ca(2+) soll also über den Thiolstatus der Zelle kontrolliert werden. Im Einklang mit diesen Befunden stimulieren Diamid und t-BHP den Ca(2+)-Efflux bei perfundierter Leber (Sies & al., 1981).

1.1.4. Bedeutung von Cystein in der Zelle

Cystein liegt in der Zelle gebunden als Bestandteil des Glutathions, gemischter Disulfide und Proteine vor. Der Anteil freien Cysteins ist im Vergleich zu Glutathion (0,1 - 10 mM) (Kosower, 1976) mit 10 - 100 µM (Gaitonde, 1967, Finkelstein & al., 1982) sehr gering und wahrscheinlich mit der hohen Reaktivität der Substanz zu erklären (Cooper, 1983). Der intrazelluläre Cystein/Cystin-Quotient ist in Zellen vieler Gewebearten (Nierenrinde, Diaphragma, Jejunum, Leber, Gehirn) sehr hoch (Crawell & Segal, 1967), es überwiegt also die reduzierte Form im Gegensatz zum Extrazellulärraum.

Neben möglichen intrazellulären Quellen (Abbau von Proteinen und Cysteinderivaten, de novo Synthese aus Serin) stammt zelluläres Cystein v.a. aus der Nahrung, wobei aus Proteinen hydrolysiertes Cystin in der Zelle rasch zu Cystein reduziert wird. Als Reduktionmittel fungieren GSH (Thiol-Disulfid-Austausch) oder NADPH in direkter Reaktion (Jocelyn, 1972). Thompson und Meister (1975) fanden, daß L-Cystin wie L-Glutamin als aktivster Akzeptor der gamma-Glutamyltranspeptidase betrachtet werden kann, sein Transport in die Zelle im Vergleich zu anderen Aminosäuren also erleichtert ist. Methionin kann L-Cysteinmangel in der Nahrung substituieren, da über den Cystathionin-Weg aus L-Methionin L-Cystein durch Schwefelaustausch mit Serin gewonnen werden kann (Jocelyn, 1972):

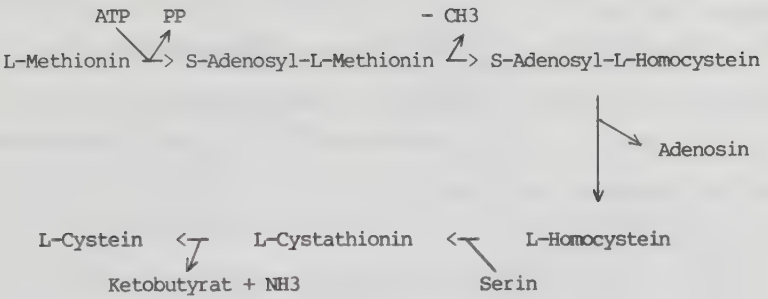


Abb.1.4.:

Umwandlung von L-Methionin in L-Cystein über den Cystathionin-Weg

Dieser Stoffwechselweg dient gleichzeitig zur Regulation des Methioningehalts der Zelle auf der Stufe des Homocysteins: bei Methioninmangel wird Homocystein remethyliert zu Methionin (Krebs & al., 1976). Neben einigen Abbauwegen von geringerer Bedeutung (Cooper, 1983) wird L-Cystein hauptsächlich durch direkte Oxidation unter Katalyse der Cysteindioxygenase zu Cysteinsulfonat umgewandelt, welches weiter zu Taurin oder Pyruvat + SO4- katabolisiert wird (Yamaguchi & al., 1975). Von untergeordneter Bedeutung ist die Transaminierung mit einer alpha-Ketosäure als Reaktionspartner, wobei aus Cystein 3-Mercaptopyruvat entsteht, welches weiter zu freiem Schwefel und Pyruvat verstoffwechselt wird (Meister & al., 1954). Auch die Umkehrreaktion vom 3-Mercaptopyruvat zum L-Cystein ist möglich, diese Reaktion soll eine der physiologischen Funktionen der Glutamintransaminase sein (Cooper & al., 1982).

In-vivo-Untersuchungen haben ergeben, daß die Cysteindioxygenase das

Schlüsselenzym des Cysteinabbaus ist, über welches der intrazelluläre L-Cysteingehalt kontrolliert wird (Kohashi & al., 1978). Dieses Enzym reagiert empfindlich auf veränderten L-Cystein- oder L-Methioningehalt in der Nahrung. Mit steigender Zufuhr der beiden Aminosäuren kann die Enzymaktivität auf das 10-20 -fache erhöht werden (Kohashi & al., 1978). In diesem feed-back-Mechanismus sehen die Autoren die Ursache für die geringen Schwankungen im L-Cysteingehalt der Leberzellen bei ihren Untersuchungen.

Cystein in gebundener Form hat sowohl strukturelle wie funktionelle Bedeutung. Disulfidbrücken zweier Cysteinthiolgruppen bestimmen die Sekundärstruktur von Proteinen und damit deren Konformation. Thiol- und Disulfidreste der Aminosäuren in Enzymen sind beteiligt an Katalyse, Substratbindung, allosterischer Regulation und Bindung von Untereinheiten (Jocelyn, 1972). L-Cystein in freier Form ist zur Protein- und GSH-Synthese notwendig. In Studien an Erythrocyten wurde beobachtet, daß die Aufnahme von Cystein in die Zelle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutathionbiosynthese ist (Heinle & al., 1976). In der Leber wurde die Km für den L-Cysteineinbau bei der GSH-Synthese mit 2,5 mM als 10 -fach höher als der L-Cysteingehalt gemessen (Tateishi & al., 1974). Außerdem konnten diese Autoren eine Proportionalität zwischen GSH-Resynthese und L-Cysteingehalt der Nahrung nachweisen (Tateishi & al., 1977). Es wird daraus gefolgert, daß der L-Cysteingehalt der Zelle der limitierende Faktor bei der GSH-Biosynthese ist.

Der Zusammenhang zwischen schwefelhaltigen Aminosäuren und intrazellulärem Glutathion in Hepatozyten wurde von Reed und Beatty (1978) folgendermaßen dargestellt:

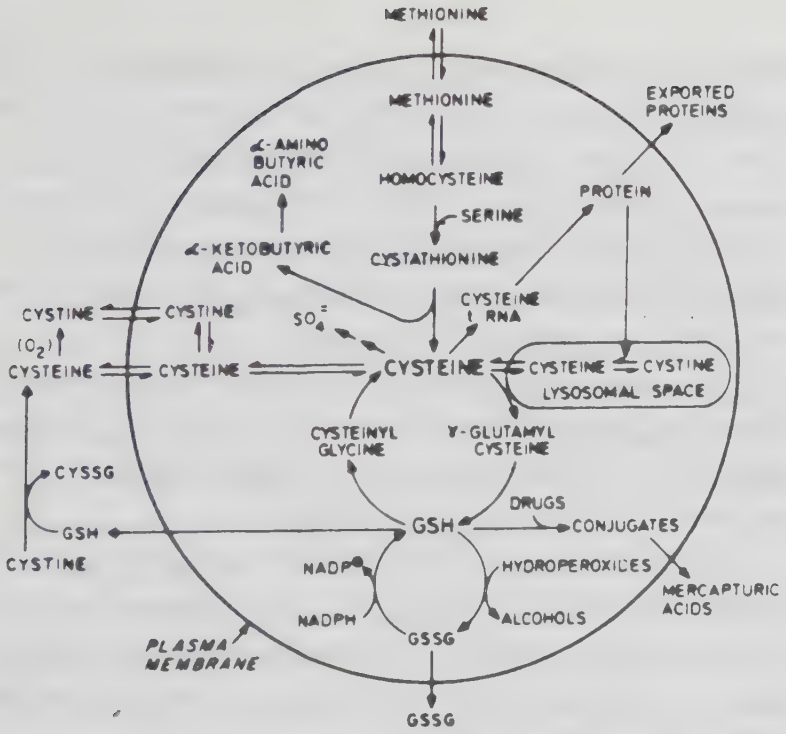


Abb.1.5:
Zusammenhang zwischen L-Methionin, L-Cystein und GSH in Hepatozyten (Reed & Beatty, 1978)

1.2. Fragestellung

1.) Exogen zugeführtes GSH steigert die Insulinsekretion nach Stimulation mit Glucose (Hellman & al., 1975; Ammon & al., 1984a). Eine Untersuchung anderer Stimulatoren der Insulinsekretion auf ihre Beeinflußbarkeit durch exogenes GSH (0,1 mM) bzw. das Thioloxidans Diamid (0,1 mM) hat gezeigt, daß bei der Verwendung verschiedener Stimulatoren Unterschiede bestehen bezüglich ihrer Abhängigkeit vom intrazellulären Redoxzustand des Glutathionsystems bzw. Ansprechbarkeit auf exogenes GSH (Ammon & al., 1984a). Bei Verwendung von Glycerinaldehyd,

Tolbutamid und Leucin konnte die Insulinsekretion durch 0,1 mM GSH signifikant gesteigert, durch Diamid gehemmt werden. Durch GSH und Diamid unbeeinflußt blieb die Sekretionsantwort nach Stimulation mit Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP. Es wurde vermutet, daß Stimulatoren, welche zu einer Zunahme des cytosolischen Calciums über den voltabhängigen Calciumkanal führen, thiolabhängig sind, solche, die über eine Erhöhung des cAMPs wirken, dagegen nicht.

a) Im Anschluß an diese Befunde wurden zunächst methodische Versuche durchgeführt (Zeitabhängigkeit der GSH-Wirkung, Einfluß der Probenentnahme auf die Versuchsergebnisse) zum Nachweis der Funktionsfähigkeit des Systems und zur Verifizierung der Methode.

b) Um abzusichern, ob der Ca(2+)-Transport in die B-Zelle oder der erhöhte intrazelluläre Ca(2+)-Spiegel selbst Voraussetzung der Thiolwirkung ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Insulinsekretion nach Stimulation mit Ca-Ionophor A 23187 durch exogenes GSH und Diamid beeinflußbar ist.

c) Die Arbeitsgruppe um Malaisse (Couturier & al., 1980, Kawazu & al., 1980) verglich den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe mit dem eines Ca-Ionophors. Das von Abdel Hamid (1983) untersuchte Tolbutamid muß in dieser Theorie allerdings als Außenseiter betrachtet werden, da es nicht durch die B-Zellmembran permeiert (Hellman & al., 1973c). Wirken Sulfonylharnstoffe tatsächlich wie Ca-Ionophore, so wird bezüglich der Beeinflußbarkeit durch GSH und Diamid auch das gleiche Ergebnis erzielt werden. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts soll ein weiterer Sulfonylharnstoff, Glibenclamid, auf seine Thiolabhängigkeit untersucht werden.

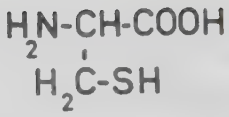
d) Bei den bisherigen Untersuchungen zur Thiolabhängigkeit der Insulinsekretion nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen wurde die

bei Glucosestimulation maximal wirksame GSH-Konzentration (0,1 mM) eingesetzt. Es bleibt daher die Frage offen, ob die gefundene Unterscheidung in thiolabhängige und thiolunabhängige Stimulatoren qualitativer oder quantitativer Natur ist. Es wäre denkbar, daß prinzipiell alle Mechanismen der Insulinsekretion thiolabhängig sind, sich aber in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Schwankungen im intrazellulären Redoxzustand unterscheiden, sodaß eine andere Konzentration des Thiols zu einer Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt. Es soll daher bei Stimlatoren, welche von GSH und Diamid bei 0,1 mM unbeeinflußt blieben, nämlich Ca-Ionophor A23187, Glibenclamid, Isoprenalin, Glucagon und db-cAMP, ein Konzentrationsbereich von 0,05 - 2 mM GSH getestet werden.

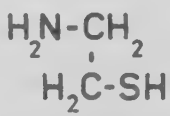
2.) Über Untersuchungen zum Einfluß exogener Thiole auf die Insulinsekretion wurde bereits berichtet. In der vorliegenden Arbeit soll anhand mehrerer thiolhaltiger Substanzen geprüft werden, ob sich Struktur-Wirkungsbeziehungen ergeben.

a) Dabei dient L-Cystein als Modellsubstanz, an der der Zusammenhang zwischen Veränderungen am Molekül durch Variation der Substituenten und der Wirksamkeit als Modulator der glucoseinduzierten Insulinsekretion untersucht werden soll. Als Derivate des L-Cysteins sind u.a. Cysteamin, D-Penicillamin und N-Acetyl-D-Penicillamin bekannt und auch therapeutisch genutzt.

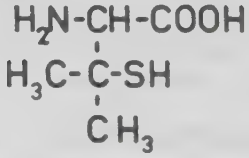
Cystein:



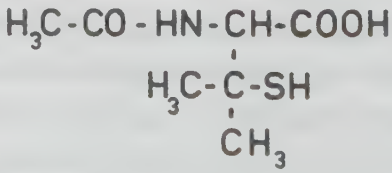
Cysteamin ist das biogene Amin von L-Cystein:



D-Penicillamin = ßß-Dimethylcystein hat zwei zusätzliche Methylgruppen:



N-Acetyl-D-Penicillamin ist im Vergleich mit L-Cystein mit zwei Methyl- und einer Acetylgruppe substituiert:



b) Wird mit den Thiolen eine Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion gefunden, soll diese mit der Wirkung des entsprechenden Disulfides verglichen werden, um die Bedeutung der Thiolfunktion zu verdeutlichen.

c) Die bisher zur Untersuchung der Thiolabhängigkeit angewandte Inkubationsmethode soll zum Zweck dieses Screenings vereinfacht und bezüglich der entstehenden Kosten rationalisiert werden.

d) Da Thiole allgemein Disulfidbindungen spalten, ist eine Störung des

Radioimmunoassays des Insulins zu erwarten. Das Ausmaß der Beeinflussung soll geprüft und bei der Auswertung der Versuche einbezogen werden.

e) Um Aufschluß über die Reaktivität bzw. Stabilität der Substanz, über eine mögliche Korrelation zwischen Stabilität und Modulatorwirkung bestimmter Konzentrationen verschiedener Thiole zu erhalten, wird die Abnahme des Thiolgehalts unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen gemessen.

Diese Untersuchungen von Struktur-Wirkungsbeziehungen könnten somit am Beginn einer Entwicklung stehen, als deren Resultat Substanzen gefunden werden, welche sich zur therapeutischen Beeinflussung des Typ II-Diabetes durch Erhöhung der Empfindlichkeit der B-Zelle gegen einen Glucosestimulus eignen.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere für die Pankreasentnahme wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 3 - 5 Monaten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 - 500 g verwendet. Diese Tiere wurden in Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur von 24°C und 55 - 65 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Standard-Trockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2. Geräte

Digital pH-Meter, Model 3560, Beckman Instruments GmbH, München

F-Diluter 5203, Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Gamma-Counter System Gamma 310, Beckman Instruments GmbH, München

Kühlzentrifuge Christ UJ II KS, Heraeus Christ GmbH, Osterode

Mikrocomputer, mit Disk-drive und XY-Plotter, Hewlett & Packard 9845

Schüttelwasserbad, Köttermann KG, Hänigsen

Spektralphotometer PM 6 mit Drucker XP2, Zeiss, Oberkochen

Stereomikroskop SM 6, Nikon, Japan

Tischcomputer P 602, Olivetti GmbH

Whirlmix, Retsch

Reaktionsgefäße 3810, Eppendorf Gerätebau , Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Halterung für 10 Netzgefäße, Eigenbau, Beschreibung s. Text

Nylonnetze, Fadendicke 50 µm

Maschenweite 54 µm

Firma Maierthaler, Köln

Plexiglashaube zur Begasung der Proben, Eigenbau

Polystyrolröhrchen, Art.-Nr.103101, 2 ml, Durchmesser 10 mm, Länge 40 mm, Firma Greiner, Nürtingen

dito, Rundboden abgeschnitten, Länge 35 mm,

als Röhre für die Netzgefäße,

Beschreibung s. Text

Reagenz- u. Zentrifugengläser, Nr.55 466, auf 32,5 mm abgeschnitten, Durchmesser 15 mm, als Inkubationsgefäße,

Firma Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf

Beschreibung s. Text

2.3. Chemikalien

N-Acetyl-D-Penicillamin	Fluka, Buchs, Schweiz
Aldehyd-Fuchsin, nach Gomori	KEPEK, Siegburg
Calcium-Ionophor A-23187	Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, USA
Collagenase (126-196 µU/mg)	Worthington Biochem. Corp Freehold, USA
Cystamin-dihydrochlorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Cysteamin-HCl	Serva GmbH & Co, Heidelberg
L(+)-Cystein	E. Merck, Darmstadt
N^{6},O^{2}-dibuturyl-adenosin-3':5'-monophosphat, cyclisch, Na-Salz	Serva GmbH & Co, Heidelberg
alpha-D-Glucose	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Ellman's Reagenz <5,5'-Dithio(-2-nitro-benzoesäure)>	Boehringer Mannheim GmbH
Glibenclamid	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
GSH, reduziert	Boehringer Mannheim GmbH
INSIK-KIT	Isotopendienst West, Dreieich
Isoprenalinsulfat	Boehringer, Ingelheim
D-Penicillamin	Serva GmbH & Co, Heidelberg

D-Penicillamin-disulfid, Monohydrat	Fluka, Buchs, Schweiz
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Rinderserumalbumin	Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo., USA
Schweine-Glucagon, hochgereinigt	Novo Lab., Kopenhagen
N,N,N',N'-Tetramethyl-diazin-dicarboxamid (Diamid)	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Fa. HAG AG, Bremen

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4. Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1. Hanks' Lösung (Hanks & Wallace, 1949)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,85 g
Aqua bidest. ad	1 000,00 ml

Diese Stammlösung wurde vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt, mit 0,5 mg/ml Glucose versetzt, um die Substratversorgung der Inseln während der Isolierung zu gewährleisten und mit $NaHCO_3$-

Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (KRB-Puffer)

Der verwendete KRB-Puffer setzte sich nach der Orginalvorschrift von Umbreit und Mitarbeitern (1972) folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
CaCl2-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH2PO4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
MgSO4-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
NaHCO3-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Diese Lösung war längere Zeit haltbar, wenn 3 getrennte, konzentrierte Lösungen hergestellt, bei 4°C aufbewahrt und kurz vor dem Versuch gemischt und verdünnt wurden.

Lösung A:	NaCl	69,20 g
	KCl	3,61 g
	KH2PO4	1,62 g
	MgSO4 7H2O	2,93 g
	Aqua bidest.ad	1 000,00 ml
Lösung B:	NaHCO3	21,10 g
	Aqua bidest.ad	1 000,00 ml
Lösung C:	CaCl2 2H2O	3,73 g
	Aqua bidest.ad	1 000,00 ml

Die Zubereitung erfolgte in folgendem Verhältnis:

Lösung A:	1 Teil
Lösung B:	1 Teil
Lösung C:	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teil

Diese Lösung wurde 30 Minuten mit Carbogen (95 % O2 + 5 % CO2) begast. Nach Zugabe und Lösen von Rinderserumalbumin (2 %) wurde der pH auf 7,35 eingestellt.

2.4.3. Puffer für Ratteninsulinlösung

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	5,77 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,05 g
Thiomersal	0,24 g
NaCl	6,00 g
Aqua bidest.	ad 1 000,00 ml

Zur Herstellung der Insulinverdünnung wurde der Puffer mit Rinderserumalbumin (6 %) versetzt.

2.4.4. Lösungen für die Bestimmung des Gesamtthiolgehalts

Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5:

KH_2PO_4	3,32 g
$K_2HPO_4 \cdot H_2O$	28,67 g
Aqua bidest.	ad 1 000,00 ml

Ellman's Reagenzlösung:

EDTA, Natriumsalz	186 mg
DTNB	4 mg
Kaliumphosphat-Puffer	ad 100,0 ml

2.4.5. Herstellung der Inkubationslösung von Ca-Ionophor A-23187

Da Ca-Ionophor A-23187 nur schwer löslich in Wasser ist, bedarf es einiger Manipulationen, um eine homogene, opal-kolloidale Lösung im Inkubationsmedium zu erhalten.

Bereitung von 25 ml Inkubationsmedium (50 µg/ml Ca-Ionophor):

2 mg Ca-Ionophor werden in 0,6 ml absolutem Äthanol unter Erwärmung im Wasserbad (37 °C) gelöst, davon 0,375 ml mit 17,5 ml Wasser in einem 250 ml-Spitzkolben unter Schütteln gemischt. Unmittelbar danach wird die opale Lösung am Rotationsverdampfer bei 37°C auf 8-10 ml eingeengt und damit der Alkohol verdampft. Man ergänzt die Lösung mit Wasser auf 17,5 ml und gibt je 2,5 ml der KRB-Stammlösungen A, B und C dazu. Albumin und Glucose werden vorsichtig gelöst und das Medium anschließend unter mäßigem Schütteln im Wasserbad bei 37°C 10 Minuten begast. Die opale Lösung wird bis zur Inkubation bei 37°C gehalten. Die Bereitung des Mediums sollte möglichst kurz vor Gebrauch erfolgen.

3. METHODEN

3.1. Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovski (1967)

3.1.1. Operation

Die Ratte wurde mit Ether narkotisiert. Durch einen Längsschnitt vom Becken bis zum Brustbein und je zwei Querschnitten an Becken und Brustbein wurde der Bauchraum geöffnet. Mit einer Pinzette zog man das Duodenum unter den Leberlappen hervor, sodaß der Ductus pancreaticus sichtbar wurde. Dieser wurde zur Leber hin abgebunden, das Duodenum zum Magen hin abgeklemmt. Nun injizierte man 10 ml eiskalte Hanks' Lösung in den Ductus pancreaticus und blähte dadurch das Pankreas auf. Das Organ wurde von Milz, Darm, Magen und Leber mit einer Schere abgetrennt und in eine Petrischale mit eiskalter Hanks' Lösung gelegt. Das noch anhaftende Fett mußte entfernt werden.

3.1.2. Isolierung der Langerhansschen Inseln

Das Pankreas wurde mit einer Schere in möglichst gleichmäßige Stücke geschnitten und mit einer 10 ml Einmalspritze in einen eisgekühlten, tarierten Meßzylinder überführt. Man reinigte die Pankreasstückchen von Blut und Fett, indem man sie mehrmals mit 10-15 ml eiskalter Hanks' Lösung aufwirbelte und nach dem Absitzen den trüben Überstand mit einer Rekordspritze absaugte. Die restliche Flüssigkeit über den Pankreasteilchen wurde mit der Wasserstrahlpumpe über eine Kanüle Nr.2 abgesaugt. Man bestimmte das Naßgewicht des zerkleinerten Organs durch

Wägung und gab dann 650 µU Collagenase pro g Naßgewicht hinzu. Ein Becherglas auf einem thermostatierbaren Magnetrührer diente als Wasserbad (37 °C), in welches der 25 ml Meßzylinder gestellt wurde. Mit einem Rührfisch wurde 2 Minuten auf höchster Stufe (1100 Umdrehungen/Minute) und weitere 12 Minuten auf niedrigster Stufe gerührt. Durch diese Methode erreichte man eine gleichmäßige, reproduzierbare und schonende Verdauung des exokrinen Gewebes. Um die für einen Versuch nötige Inselzahl zu erhalten, wurden meist zwei Pankreata zusammen verdaut.

Die Aktivität des Enzyms wurde nach der angegebenen Verdauungszeit dadurch gestoppt, daß man den Inhalt des Meßzylinders in eine eisgekühlte Petrischale gab. Der Meßzylinder wurde nochmals mit 2-3 ml Hanks' Lösung ausgespült. Das angedaute Gewebe wurde zur weiteren Zerkleinerung und Homogenisierung 10-15 mal langsam und vorsichtig in eine 10 ml Einmalspritze aufgezogen, wieder herausgedrückt und anschließend durch ein Sieb in den 25 ml Meßzylinder gegeben, welcher bereits 20 ml Hanks' Lösung enthielt. Durch die starke Verdünnung des Gemischs sollte die Aktivität des Enzyms gehemmt werden.

Eine grobe Trennung der Langerhansschen Inseln vom exokrinen Gewebe erreichte man dadurch, daß aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichts der beiden Gewebearten die Inseln rascher sedimentieren. Der Überstand der Suspension wurde nach 3 Minuten abgesaugt, der Inhalt des Meßzylinders erneut mit Hanks' Lösung aufgeschwemmt und geschüttelt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis der Anteil des exokrinen Gewebes soweit reduziert war, daß es möglich war, die Langerhansschen Inseln unter dem Stereomikroskop mit einer Peterson Pipette auszusortieren.

Alle Arbeitsvorgänge, mit Ausnahme des Verdauens von exokrinem Gewebe,

wurden im Eisbad bei 0°C durchgeführt.

3.2. Vorinkubation

Die Vorinkubation diente der Stoffwechselregenerierung nach dem Isolierungsprozess. Dazu wurden die isolierten Langerhansschen Inseln in einem 5 ml Gläschen gesammelt und die mitgeschleppte Hanks' Lösung nach dem Absitzen der Inseln vorsichtig abgesaugt. Als Vorinkubationsmedium wurden 2 ml KRB-Puffer (2.4.2.), welche 2 % Rinderserumalbumin und eine substimulatorische Glucosemenge (2,8 mM) enthielt, zu den Inseln pipettiert. Das Gläschen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen (95 % O2 + 5 % CO2) begast und mit einer Frequenz von 40 Bewegungen/Minute im Wasserbad bei 37°C 30 Minuten geschüttelt. Nach Beendigung der Vorinkubation wurden die Inseln dreimal mit kalter Hanks' Lösung gewaschen, um sie von eventuell anhaftendem, aus beschädigten Zellen stammendem Insulin zu befreien.

3.3. Hauptinkubation

3.3.1. Hauptinkubation bei den Versuchen zur Untersuchung der Bedeutung von GSH für die Insulinsekretion Langerhansschen Inseln der Ratte bei Verwendung verschiedener Stimulatoren

Für die Hauptinkubation wurden je 5 Inseln in eisgekühlte 2 ml-Polystyrolgläschen einsortiert. Mitgeschleppte Flüssigkeit wurde unter dem Mikroskop vorsichtig abgesaugt und gleichzeitig die Inselzahl nochmals kontrolliert.

Als Inkubationsmedium diente 1 ml KRB-Puffer mit 2 % Rinderserumalbu-

min und dem jeweils zu untersuchenden Stimulator der Insulinsekretion. Der pH wurde auf 7,35 eingestellt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Wasserbad unter mäßigem Schütteln (40 Bewegungen/Minute). Jedes Gläschen wurde direkt mit Carbogen begast. Die Inkubationszeit betrug für alle Proben 40 Minuten. Zur Insulinbestimmung wurde allen Proben 0,1 ml abpipettiert und bei -15°C eingefroren.

Versuche mit GSH:

Wie Abb.3.8 und Tab.3.8 zeigen, nimmt der Gehalt an freiem, DTNB-reaktivem Thiol einer Lösung von 0,1 mM GSH im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen rasch ab (in 60 Min. 28 % des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Minuten). Daher ist eine nur kurze Inkubationszeit sinnvoll.

Versuche zur Zeitabhängigkeit der Insulinsekretion haben gezeigt (Tab.3.1 und Abb.3.1), daß GSH keinen Einfluß auf die Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose (11,1 mM) hat, wenn man es zu Beginn der Inkubation dem Inkubationsmedium zusetzt. Erfolgt der Zusatz von GSH nach einer 30 minütigen Inkubation, so erzielt man eine signifikante Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion. Wie aus Abb.3.1 zu ersehen ist, bleibt dieser Effekt aber nur 10 Minuten erhalten, denn zwischen der 40. und der 60. Minute verlaufen die GSH- und die Kontrollkurve parallel.

Deshalb wurde bei den Versuchen mit GSH nach einer 30 minütigen Inkubation mit dem Stimulator 0,1 ml der Probe abpipettiert und für die Insulinbestimmung eingefroren. Nach Zusatz von 0,1 ml gleichen Mediums mit und ohne 1 mM GSH wurde weitere 10 Minuten inkubiert, nach gründlichem Mischen der Probe ebenfalls 0,1 ml entnommen und eingefroren.

Versuche mit Diamid:

Um einen deutlichen Hemmeffekt des Diamids zu erzielen, bedarf es einer längeren Inkubationszeit. Daher wurde Diamid (0,1 mM) zu Beginn der Inkubation zugesetzt. Wie in einem Vorversuch gezeigt werden konnte (Abb.3.2, Tab.3.2), haben die in den GSH-Versuchen notwendige Probenentnahme und Mediumzusatz keinen Einfluß auf die Meßergebnisse. Daher wurde in den Diamid-Versuchen auf die gleiche Behandlung (s.o.) verzichtet. Da für die Versuche mit GSH und Diamid unterschiedliche Inkubationszeiten notwendig sind, ist lediglich ein qualitativer Vergleich der Ergebnisse möglich.

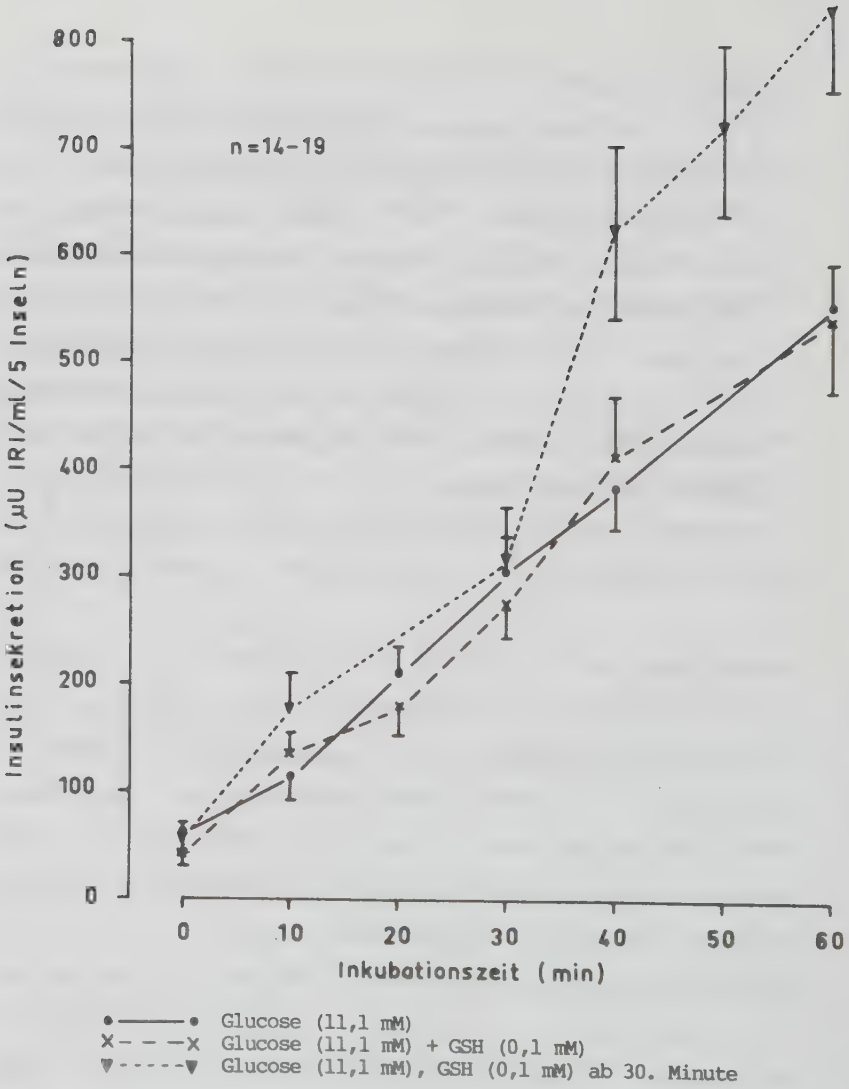


Abb.3.1:

Zeitlicher Verlauf der Wirkung von Glucose und GSH auf die Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte.

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (11,1 mM) mit und ohne GSH

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 3.1:
Zeitlicher Verlauf der Wirkung von Glucose (11,1 mM) bzw. Glucose (11,1 mM) und GSH (0,1 mM) auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte.

	Inkubationszeit (min)						
	0	10	20	30	40	50	60
Glucose (11,1 mM)	59 ± 11 (18)	113 ± 18 (18)	209 ± 25 (18)	303 ± 37 (17)	381 ± 36 (19)	-	552 ± 40 (18)
Glucose (11,1 mM) + GSH (0,1 mM)	40 ± 10 (18)	134 ± 19 (18)	177 ± 22 (18)	275 ± 32 (18)	411 ± 57 (19)	-	534 ± 65 (17)
Glucose (11,1 mM) ab 30. Min. + GSH (0,1 mM)	54 ± 10 (15)	177 ± 36 (15)	-	312 ± 52 (14)	620 ± 82 (14)	715 ± 85 (15)	824 ± 76 (14)

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (11,1 mM) bzw. Glucose (11,1 mM) und GSH (0,1 mM) inkubiert.

Mittelwert IRI/ml/ 5 Inseln ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

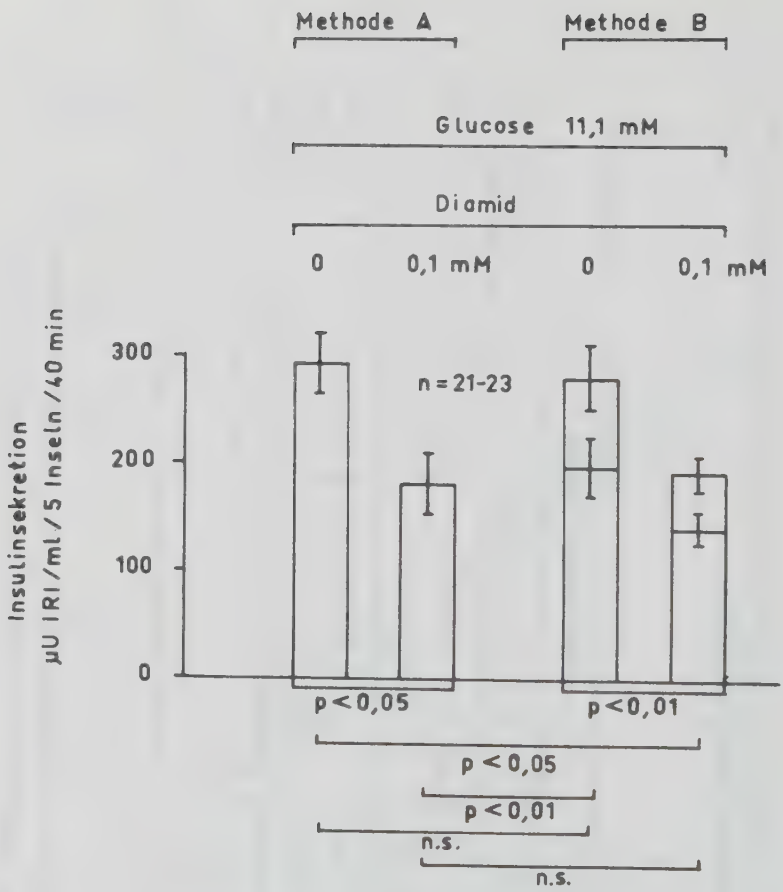


Abb.3.2:

Einfluß der Probenentnahme auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Inkubation: je 5 Inseln 40 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (11,1 mM), mit und ohne Diamid

A : ohne Probenentnahme
B : nach 30 Min. wurde die Probe geschüttelt, 0,1 ml Medium entnommen, 0,1 ml Medium ergänzt und 10 Min. weiterinkubiert.

Mittelwert $\pm$ SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab.3.2:

Einfluß der Probenentnahme auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte mit und ohne Diamid (0,1 mM)

		µU IRI/ml	p	
A	Glucose (11,1 mM)	293 ± 26 (21)	p<0,05	n.s.
	Glucose (11,1 mM) Diamid (0,1mM)	183 ± 27 (23)		
B	Glucose (11,1 mM)	281 ± 31 (22)	p<0,01	n.s.
	Glucose (11,1 mM) Diamid (0,1mM)	192 ± 16 (21)		

Je 5 Inseln wurden 40 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (11,1 mM), mit und ohne Diamid (0,1 mM) inkubiert.

A : ohne Probenentnahme

B : nach 30 Minuten wurde die Probe geschüttelt, 0,1 ml Medium entnommen, 0,1 ml Medium ergänzt und 10 Minuten weiterinkubiert.

Mittelwert ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
IRI = immunoreaktives Insulin

3.3.2. Hauptinkubation bei Versuchen zur Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Thiolen auf die durch Glucose stimulierte Insulinsekretion bei Langerhansschen Inseln der Ratte

3.3.2.1. Erstellung einer verbesserten Versuchsanordnung

Um mehrere SH-haltige Substanzen in einem Screening auf ihre Fähigkeit, die durch Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion zu steigern, zu prüfen, bedarf es einer möglichst einfachen Methode.
Bei der bisher angewandten Methode wurde dem die Langerhansschen Inseln enthaltenden Reaktionsgefäß nach der ersten, 30-minütigen Hauptinkubation zur Regeneration der Zellen (KRB - Albumin - Puffer + Glucose, 11,1 mM) eine Lösung des Thiols in KRB-Puffer zugesetzt und weitere 10 Minuten inkubiert. Daraus entstanden folgende Nachteile:
1.) Das während der ersten Hauptinkubation sezernierte Insulin könnte eine feed-back-Hemmwirkung auf eine weitere Insulinsekretion ausüben.
2.) Um den Effekt des Thiols zu messen, mußte der Insulingehalt sowohl nach 30 Minuten als auch nach der für das Thiol festgesetzten Inkubationszeit gemessen werden.
3.) Um ein zeitversetztes Pipettierschema einhalten zu können, mußten zwei Personen zusammenarbeiten.
Solche Schwierigkeiten werden umgangen, wenn die Inseln mit einem geeigneten Träger aus dem regenerierenden Medium in das thiolhaltige Medium transportiert werden können.

3.3.2.1.1. Netzgefäße

Dazu geeignet schienen die Netzgefäße zu sein, welche in unserem Arbeitskreis zur Messung der Calciumaufnahme verwendet werden und in

der Dissertation von Hägele (1981) beschrieben wurden.

Dabei wurde einem Polystyrolgläschen der Rundboden abgesägt und an einem Ende mit einem Nylonnetz Maschenweite 54 µm beklebt. Dieses Netzgefäß mußte folgende Bedingungen erfüllen:

1.) Bei mäßigem Schütteln im Wasserbad (ca. 100 Bewegungen/Minute) sollte ein guter Konzentrationsausgleich zwischen der Flüssigkeit innerhalb und außerhalb des Netzgefäßes stattfinden. Ist dies nicht gegeben, so reichert sich von den B-Zellen sezerniertes Insulin in der unmittelbaren Umgebung der Inseln an und löst eine feed-back-Hemmung aus.

2.) Die Kapillarwirkung des Röhrchens sollte beim Umsetzen des Netzgefäßes von einem Medium ins andere einerseits das Auslaufen des ersten Mediums, andererseits aber auch das Aufsteigen des neuen Mediums nicht behindern.

Um auszutesten, bei welchem Durchmesser des Netzgefäßes obige Bedingungen besser erfüllt werden, wurden Netzgefäße mit Durchmesser 6,5 mm und 10 mm in Inkubationsgefäße mit 1 ml Wasser gestellt, in das Netzgefäß 0,1 ml einer konzentrierten Lebensmittelrot-Lösung pipettiert und 10 Minuten mit 100 Bewegungen/Minute geschüttelt.

Es war rein optisch erkennbar, daß im Netzgefäß mit 10 mm Durchmesser der Konzentrationsausgleich besser gewährleistet war. Auch die Benetzung und der Flüssigkeitsablauf waren zufriedenstellend.

3.3.2.1.2. Halterung

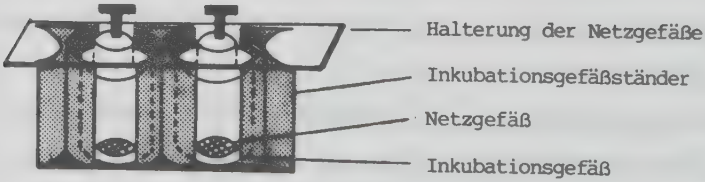
Um beim Umsetzen der Netzgefäße eine Zeitdifferenz vom ersten zum letzten Gefäß zu vermeiden, war es wünschenswert, eine Halterung zu entwickeln, welche ermöglichte, daß 10 Gefäße eines Inkubationsgefäßständers gemeinsam transportiert werden. Zu diesem Zweck wurden

Plexiglasschienen mit den Maßen 2 : 0,6 : 20 cm gefertigt, in welche 10 Löcher mit 11 cm Durchmesser gebohrt wurden. Um die Netzgefäße in der Bohrung festzuhalten, wurden von einer Seite her Schräubchen in die Bohrung hineingetrieben.

Aufsicht:

Auf diese Weise ist eine einheitliche Behandlung erleichtert.

Anordnung der inkubationsfertigen Gefäße:



3.3.2.2. Durchführung der Hauptinkubation

Die Hauptinkubation gliedert sich in zwei Schritte: während des ersten Hauptinkubationsschritt sollte das Inselgewebe wieder auf 37°C erwärmt und durch Sauerstoffzufuhr der Stoffwechsel aktiviert werden; im zweiten Hauptinkubationsschritt enthielten die Inkubationsmedien verschiedene Konzentrationen der zu untersuchenden Thiole, deren Wirkung auf die glucosestimulierte Insulinsekretion gemessen werden sollte. Zur Kontrolle der Funktionsfähigkeit der Inseln wurden Proben nur mit verschiedenen Glucosemengen (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert.

Um die mit Hanks' Lösung gewaschenen Inseln in die Netzgefäße übertra-

gen zu können, hängte man die Lochschienen, in welchen die Netzgefäße festgeschraubt waren, über eine Schale mit eiskalter Hanks' Lösung, so daß die Gefäße in die Lösung tauchten. Es wurden 5 Inseln pro Netzgefäß einsortiert. Dabei steigt die Hanks' Lösung in das Netzgefäß auf. Für den ersten Hauptinkubationsschritt wurde je 1 ml KRB-Puffer mit 2 % Rinderserumalbumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) in die Reaktionsgefäße, welche in zu den Schienen passenden Reagenzglasständern fixiert waren, pipettiert. Vor dem Umsetzen der Netzgefäße aus der Hanks' Lösung in das Inkubationsmedium trocknete man die Netze kurz auf Zellstoff ab, um ein Verschleppen der Flüssigkeit zu vermeiden. Die erste Hauptinkubation erfolgte 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad bei 100 Bewegungen/Minute. Um auch während der Hauptinkubation eine Begasung mit Carbogen zu sichern, wurde über die Reagenzglasständer im Wasserbad eine mit Blei beschwerte Plexiglashaube (22,5 cm : 21 cm : 8,5 cm) gestellt, in welche Carbogen eingeleitet wurde.

Die Lösungen der Thiole wurden unmittelbar vor Gebrauch im Eis hergestellt, da es sich z.T. um instabile Substanzen handelt und sonst eine Abnahme des Thiolgehalts durch Oxidation zu befürchten ist (Abb.3.8, Tab.3.7). Nach Beendigung der ersten Hauptinkubation wurde das zweite Hauptinkubationsmedium (je 1 ml KRB-Puffer mit 2 % Rinderserumalbumin, verschiedenen Glucose- und Thiolkonzentrationen) in den Inkubationsgefäßen kurz angewärmt und die Reagenzglasständer mit den Netzgefäßen aus dem Wasserbad genommen. Vor dem Umsetzen in das Medium der zweiten Hauptinkubation wurden die Netzgefäße abermals kurz auf Zellstoff abgetupft. Die folgende Inkubation wurde unter den gleichen Bedingungen wie die erste ausgeführt. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten. Um die Sekretionsleistung der Inseln nach 10 Minuten sofort zu stoppen, stellte man die Gefäße in Eis. Zur Durchmischung des Inkubationsme-

diums wurden die Schienen mehrmals langsam auf und ab bewegt. Zog man dann die Netzgefäße mit Kontakt am Inkubationsgefäßrand langsam aus dem Medium, floß die Flüssigkeit fast vollständig vom Netzgefäß ins Inkubationsgefäß. Das Inkubationsmedium der einzelnen Gläschen wurde in 2 ml Polystyrolgläschen für die radioimmunologische Bestimmung des sezernierten Insulins bei -15°C eingefroren. Nach der Inkubation wurden die Inseln in den Netzgefäßen mit einer 0,1 % wässrigen Lösung von Aldehyd-Fuchsin nach Gomori (1950) angefärbt und unter dem Stereomikroskop nachgezählt.

3.3.2.3. Einfluß der Vorbehandlung der Langerhansschen Inseln der Ratte auf die Steigerung der durch Glucose (11,1 mM) stimulierten Insulinsekretion durch Thiole

Wie unter 3.3.1. (Versuche mit GSH) beschrieben, zeigt sich die Steigerung der durch Glucose stimulierten Insulinsekretion durch GSH nicht, wenn es zu Beginn der Inkubation zugesetzt wird, wohl aber, wenn es nach einer 30 minütigen Inkubation zupipettiert wird.
Daraus ergibt sich die Frage, ob die Insulinsekretion der Insel bereits stimuliert sein muß, damit eine Wirkung des Thiols zu erwarten ist, oder ob eine Regenerierung der Insel durch substimulatorisches Medium bei 37°C und Carbogenbegasung zum gleichen Ergebnis führt.
Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis aus Versuchen, bei denen während der ersten 30 Minuten mit substimulatorischer Glucosemenge (2,8 mM) inkubiert und die Insulinsekretion erst zusammen mit der Cysteingabe durch Glucose (11,1 mM) stimuliert wurde. Vergleicht man dieses Ergebnis (Tab.3.3) mit der unter 4.2.1. beschriebenen Dosis-Wirkungsbeziehung für Cystein (Tab.4.3), so kann man daraus schließen, daß die

bereits stimulierte B-Zelle auf kleinere Cysteinkonzentrationen (3 mM: $p < 0,01$) reagiert, als die nicht stimulierte (3,5 mM: n.s., 5 mM: $p<0,01$).

Tab.3.3: Einfluß von verschiedenen Cysteinkonzentrationen (3,5 mM - 7,5 mM) auf die durch Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte

	Glucose (11,1 mM)					
Cystein	0	3,5 mM	4,5 mM	5 mM	6 mM	7,5 mM
	A	B	C	D	E	F
	109 ± 12	133 ± 18	150 ± 27	171 ± 21	196 ± 22	221 ± 22
	(43)	(34)	(28)	(30)	(26)	(34)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit Glucose (11,1 mM) mit und ohne verschiedenen Cysteinkonzentrationen gesetzt. Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (µU IRI/ml/5 Inseln/10 Minuten).

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern

Statistische Auswertung: AB, AC: n.s.; AD: $p < 0,01$, AE: $p < 0,001$, AF: $p < 0,001$

3.3.3. Vergleich der unter 3.3.1. und 3.3.2. beschriebenen Methoden

Um die beiden Methoden vergleichen zu können, wurde der zeitliche Verlauf der Insulinsekretion nach Stimulation mit Glucose (11,1 mM) gemessen. Die Inseln befanden sich dabei in den Netzgefäßen. Es wurde einmal nach 30 Minuten die Netzgefäße mit den Inseln in neues Medium gesetzt (Methode B), parallel dazu einmal die Netzgefäße nicht umgesetzt (Methode A). Die Probenentnahme erfolgte in der 30., 40., 50., 60. Minute der Inkubation.

Aus den Ergebnissen (Tab.3.4 u. 3.5) zeigt sich, daß die Insulinsekretion nach dem Umsetzen der Netzgefäße linear verläuft ($r = 0,997$). Da die in den ersten 30 Minuten sezernierte Insulinmenge bei Methode B nicht mitbestimmt wird, erhält man kleinere Insulinwerte. Bei kleineren Meßwerten ergeben sich aber eher signifikante Unterschiede (vgl. signifikante Auswertung der Tabellen 3.4 u. 3.5). Bei Methode A ist der Anstieg zwar ebenfalls deutlich, für $n = 12$ aber noch nicht signifikant.

Abb.3.3 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

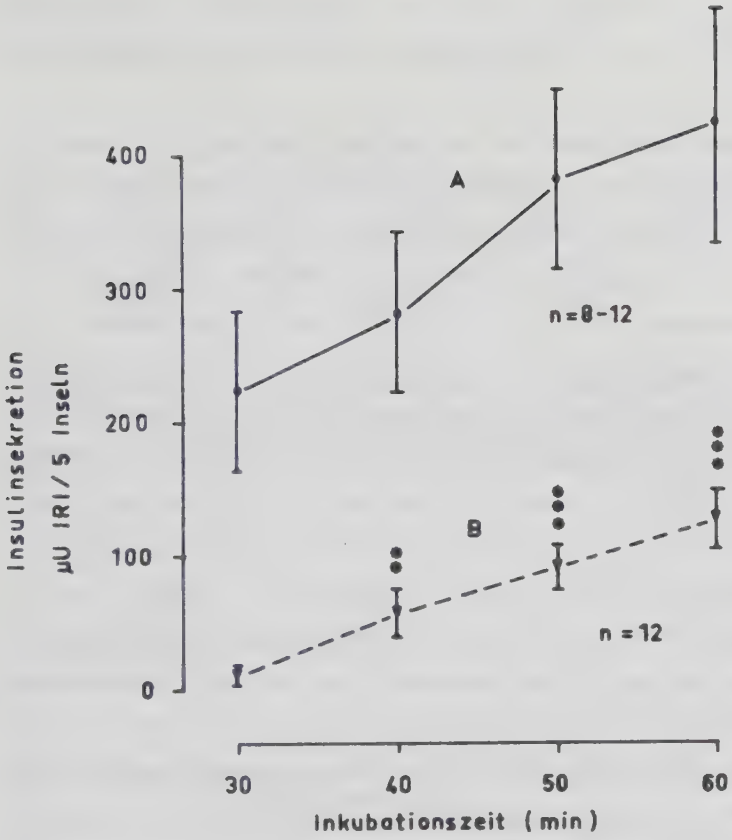


Abb.3.3:

Zeitlicher Verlauf der Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte nach Stimulation mit Glucose (11,1 mM) - Vergleich zweier Methoden

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (11,1 mM), ab der 30. Minute wurden in 10 minütigen Abständen Proben entnommen.

A : ohne Umsetzen der Netzgefäße, Methode nach 3.3.1.
B : mit Umsetzen der Netzgefäße nach 30 Min., Methode nach 3.3.2.

Mittelwert $\pm$ SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab.3.4: Zeitlicher Verlauf der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte nach Stimulation mit Glucose (11,1 mM), Methode A (3.3.1.)

	Glucose (11,1 mM)			
Zeit (min)	30	40	50	60
	A 224 ± 61 (12)	B 283 ± 60 (11)	C 384 ± 65 (9)	D 426 ± 89 (8)

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit 2 % Albumin und Glucose (11,1 mM) inkubiert. Ab der 30. Minute wurden in 10 minütigem Abstand Proben entnommen.
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern
Statistische Auswertung: Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

Tab.3.5: Zeitlicher Verlauf der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte nach Stimulation mit Glucose (11,1 mM), Methode B (3.3.2.)

	Glucose (11,1 mM)			
Zeit (min)	30	40	50	60
	A 12 ± 5 (12)	B 58 ± 13 (12)	C 93 ± 15 (12)	D 127 ± 22 (12)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer mit 2 % Albumin und Glucose (11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml gleichen Puffers gesetzt. Ab der 30. Minute wurden in 10 minütigem Abstand Proben entnommen.
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern.
Statistische Auswertung: AB: $p < 0,01$, AC :$p < 0,001$, AD: $p < 0,001$, BC, CD: n.s.

3.4. Insulinbestimmung

Die Messung der Insulinkonzentration im Hauptinkubationsmedium erfolgte in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay nach der Doppelantikörpermethode (Soeldner & Slone, 1965) mit dem INSIK-KIT.

3.4.1. Durchführung

Zur Erstellung der Eichkurve von 0 - 1 000 µU Insulin (bei 3.3.1.) bzw. 0 - 600 µU Insulin (bei 3.3.2.) wurde Ratteninsulin verwendet. Um den Einfluß der Thiole auf den Radioimmunoassay zu korrigieren, inkubierte man das Insulin für die Eichkurven der jeweiligen Thiolkonzentration analog zum Versuch 10 Minuten mit der betreffenden Thiolkonzentration bei 37°C unter Carbogenbegasung und fror die Proben ebenfalls ein.

Vor der Durchführung der Insulinbestimmung mußten die Proben sowie die Standardinsulinlösungen verdünnt werden. Bei den Versuchen, welche mit der unter 3.3.1. beschriebenen Methode durchgeführt wurden, pipettierte man mit einem automatischen Diluter 0,01 ml ab und fügte 0,1 ml des Phosphat-Puffers, welcher dem INSIK-KIT beiliegt, hinzu. Da bei den mit der unter 3.3.2. beschriebenen Methode durchgeführten Versuchen nur das in 10 Minuten sezernierte Insulin gemessen wurde und daher niedrigere Insulinwerte zu erwarten sind, wurde in diesen Versuchen zur Erhöhung der Genauigkeit des Radioimmunoassays das Probenaliquot von 0,01 ml auf 0,03 ml erhöht und mit 0,07 ml Puffer verdünnt.

Phosphat-Puffer pH 7,4, Type B:

Na_2HPO_4 2 H_2O	2,120 g
EDTA $2H_2O$, Dinatriumsalz	0,745 g
Rinderserumalbumin	0,200 g
Aqua bidest.	ad 200,00 ml

Als Leerwert (Nullpunkt der Eichkurve) wurden jeweils 0,01 ml bzw. 0,03 ml der zur Inkubation verwendeten Medien wie oben behandelt.

Der lyophilisierte Antikörper wurde nach Vorschrift gelöst und je 0,1 ml den verdünnten Proben und Standardinsulinlösungen zugefügt. Nach sorgfältigem Mischen auf dem Whirlmix stellte man die Proben für 6 Stunden in den Kühlschrank (4 °C). Danach wurden jeweils 0,1 ml der 125-Jod-Insulinlösung zupipettiert. Nach erneutem Mischen folgte eine weitere Inkubation von 18 Stunden bei 4°C. Jede Probe wurde dann mit 1 ml des oben beschriebenen kalten Phosphat-Puffers verdünnt und bei 4°C 20 Minuten mit 4 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, um den Doppelantikörperkomplex am Röhrchenboden anzuhaften. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Man stellte die Gläschen auf den Kopf, um restliche Flüssigkeit ablaufen zu lassen und saugte am oberen Rande hängende Tröpfchen mit der Wasserstrahlpumpe ab.

Dann folgte die Messung im Gamma-Counter. Die Zähldauer betrug entsprechend der Totalaktivität des verwendeten Kits 1 oder 2 Minuten.

3.4.2. Berechnung der Insulinwerte

Aus den Werten der Doppelbestimmung wurden die Mittelwerte der Zählraten ermittelt. Die nach 3.3.1. durchgeführten Versuche wurden mit einer Eichgeraden ausgewertet. Dazu dividierte man den Leerwert der jeweiligen Eichgerade durch die Zählrate der Proben und der Eichgera-

denproben und erhielt auf diese Weise Quotienten größer 1. Die Berechnung der Insulinwerte der Proben erfolgte dann anhand der Eichgeraden mit einem Computerprogramm.

Da bei den nach 3.3.2. durchgeführten Versuche, bedingt durch die 10 minütige Inkubationszeit, die zu messenden Insulinwerte im untersten Bereich der Eichkurve lagen, erwies sich eine Auswertung anhand der mit einem Mikrocomputer (Hewlett & Packard 9845 B) geplotteten Eichkurve als vorteilhaft.

Die Angaben des Insulingehalts bedeuten µU IRI (immunoreaktives Insulin) pro 5 Inseln; deshalb mußten die durch das Computerprogramm ermittelten Ergebnisse gegebenenfalls korrigiert werden, wenn bei der Kontrolle der Inselzahl nach der Färbung mehr oder weniger Inseln gefunden wurden. Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM; als n geht der aus einer Probe ermittelte Meßwert in die Berechnung ein. An einem Versuchstag wurden 3 Proben eines Parameters inkubiert. Signifikante Unterschiede sind mit dem t-Test nach Student berechnet.

3.4.3. Einfluß von Thiolen auf den Radioimmunoassay des Insulins

Thiole greifen Disulfidbrücken an, führen zu deren Spaltung bzw. zur Neubildung gemischter Disulfide nach folgenden Gleichungen (Jocelyn, 1972):

$$R\text{-}SH + X\text{-}S\text{-}S\text{-}X \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}X + X\text{-}SH$$

$$R\text{-}SH + R\text{-}S\text{-}S\text{-}X \longrightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + X\text{-}SH$$

Solche Austauschreaktionen zwischen Thiolen und Insulin bewirken also eine Spaltung der Peptidkettenverknüpfung und damit eine Änderung der Konformation. Ein so verändertes Insulinmolekül verliert seine Affinität zum Antikörper, d.h. seine Immunoreaktivität und ist deshalb durch

die radioimmunologische Bestimmung nicht mehr erfaßbar. Auch Wechselwirkungen mit dem Antikörper sind denkbar.

Es wurde daher auch schon von Hellman & al. (1975b) darauf hingewiesen, daß es einer Korrektur der in Gegenwart von Thiolen sezernierten Insulinmenge durch Einbeziehung des Thiols in die Eichkurve bedarf.

Die Abbildungen 3.4 - 3.7 zeigen den Einfluß verschiedener Konzentrationen der Thiole auf die Insulineichgeraden.

Um den Einfluß der verschiedenen Thiole quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils die Abweichung der Insulineichgerade bei 1 mM des betreffenden Thiols von der Kontrolleichgerade ohne Thiol bestimmt. Das Computerprogramm errechnet bei der Erstellung der Eichgerade nach der Gleichung $y' = A + Bx$ die Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion. Wählt man für y' den größten Wert der Eichgeraden, so erhält man für x den betreffenden y-Achsenabschnitt dieses Punktes der Eichgerade. Setzt man diese y-Achsenabschnitte von Kontroll- und Eichgerade mit Thiol ins Verhältnis, errechnet man, wieviel Prozent des y-Achsenabschnitts der Kontrolleichgeraden der y-Achsenabschnitt der Eichgerade mit Thiol beträgt. Man erhält damit ein Maß für die Abweichung der Steigungen der Geraden. Tab.3.6 zeigt die so ermittelten Prozentzahlen.

Es zeigt sich deutlich, daß Thiole bei einer Konzentration von 1 mM einen Einfluß auf die Insulineichgerade haben. Bei dieser Konzentration vermindert GSH die Steigung der Insulineichgerade mit 18,97 % am stärksten, es folgt N-Acetyl-D-Penicillamin (13,97 %). L-Cystein, Cysteamin und D-Penicillamin scheinen sich in ihrer Wirkung auf den Radioimmunoassay in dieser Konzentration zu gleichen (6,36 - 8,8 %). Aus den in Tab.3.6 ermittelten prozentualen Abweichungen bei 1 mM des Thiols lassen sich aber noch keine Rückschlüsse über die Grenzkonzen-

tration für die Thiolkonzentration bei der Insulinbestimmung ziehen. Als Beispiel sei die Beeinflussung der Insulineichgerade durch L-Cystein und Cysteamin herausgegriffen: obwohl beide Substanzen sich bei 1 mM Thiol in der Beeinflussung der Insulineichgeraden nicht wesentlich unterscheiden (8,8 % und 6,36 %), ergeben 6 mM L-Cystein und 3 mM Cysteamin ähnliche prozentuale Abweichungen der Eichgeradensteigung im Vergleich zur Kontrolle.

Je nach dem Ausmaß der Beeinflussung der Insulineichgerade durch höhere Thiolkonzentrationen ergab sich eine Grenzkonzentration, oberhalb der eine Insulinbestimmung nicht mehr möglich war, da die Gerade zu flach verlief (für GSH, D-Penicillamin 2 mM, für Cystein 7 mM, für Cysteamin, N-Acetyl-D-Penicillamin 3 mM).

Tab.3.6: Einfluß von verschiedenen Thiolen in einer Konzentration von 1 mM auf die Steigung der Insulineichgeraden

Thiol	Kontrolle = 100 %	Abweichung in %
GSH	81,03	18,97
L-Cystein	91,20	8,80
Cysteamin	93,64	6,36
D-Penicillamin	92,77	7,23
N-Acetyl-D-Penicillamin	86,09	13,91

Die y-Achsenabschnitte der Eichgeraden wurden mit dem Computerprogramm errechnet und ihre prozentuale Abweichung von der Kontrolle ermittelt.

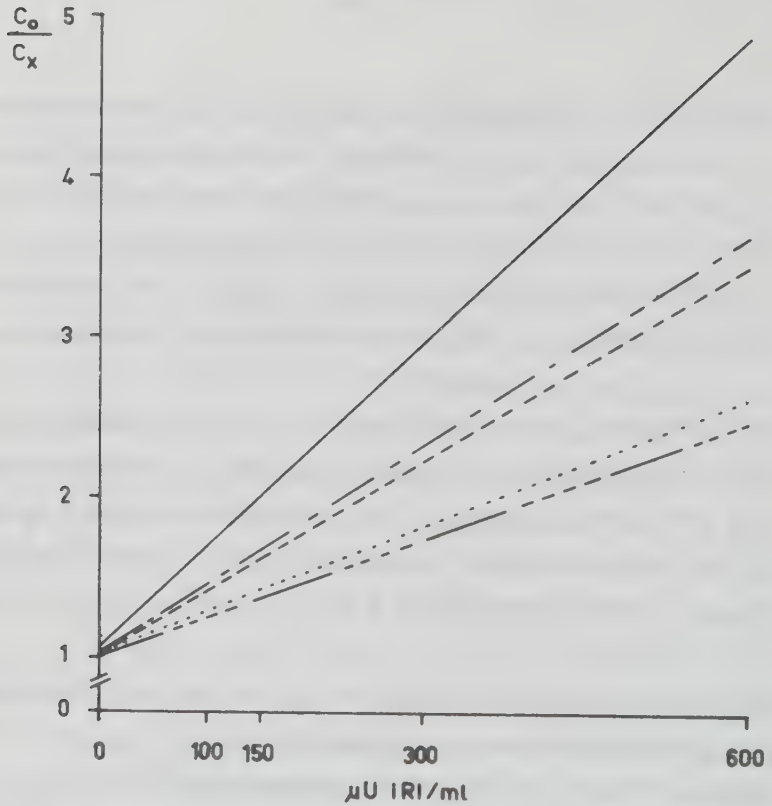


Abb.3.4:

Einfluß von verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen auf die Insulin-eichgeraden des Radioimmunoassays

C_o = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin

C_x = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Insulin

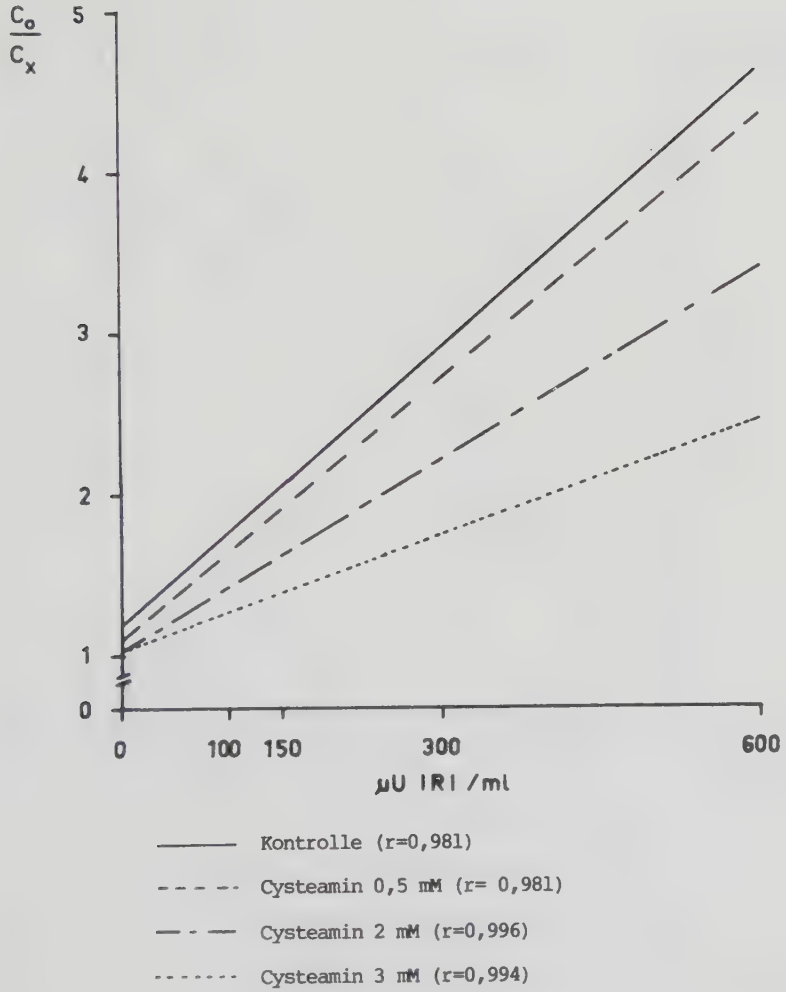


Abb.3.5:

Einfluß von verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen auf die Insulin-eichgeraden des Radioimmunoassays

C_o = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin

C_x = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Insulin

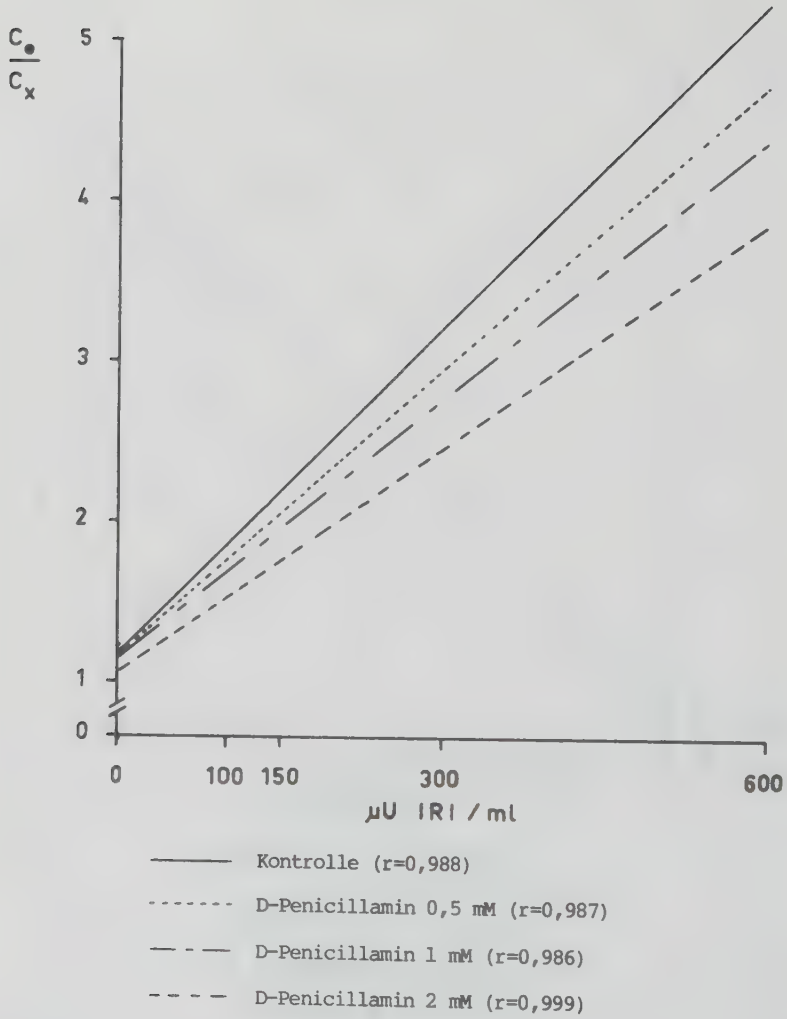


Abb.3.6:

Einfluß von verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen auf die Insulineichgeraden des Radioimmunoassays

C_o = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin

C_x = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Insulins

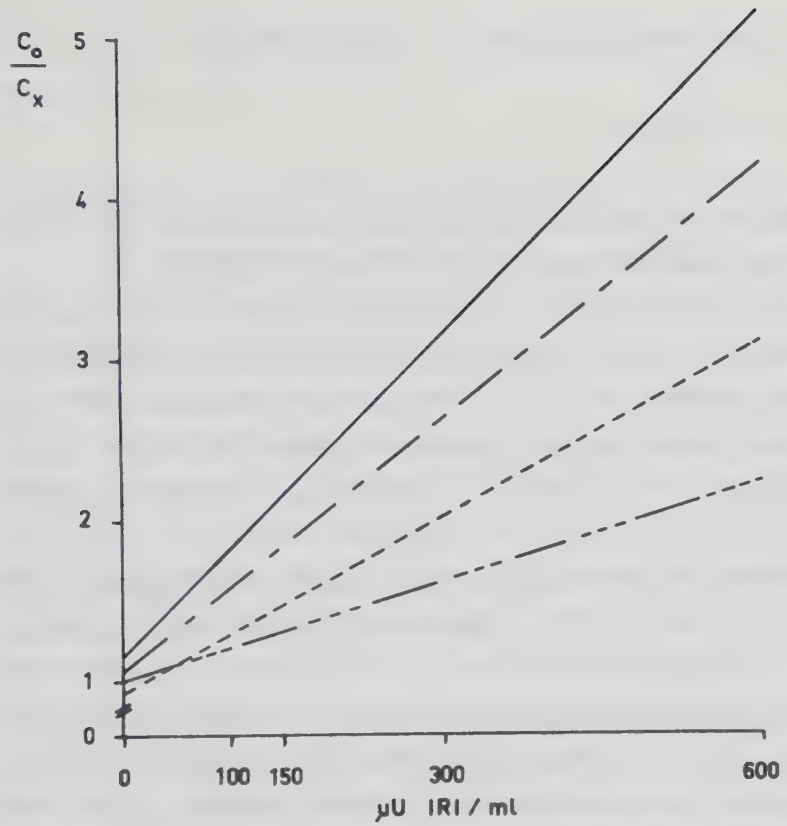


Abb.3.7:

Einfluß von verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen auf die Insulineichgeraden des Radioimmunoassays

C_o = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei Abwesenheit von unmarkiertem Insulin

C_x = gebundene Radioaktivität von markiertem Insulin bei verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Insulins

3.5. Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium

3.5.1. Durchführung

Die Messung des Thiolgehalts diente zur Ermittlung der Stabilität der Thiole unter Eiskühlung und unter Inkubationsbedingungen.
Es wurde die von Cikryt (1979) modifizierte Methode nach Ellman (1959) angewandt. Die Bestimmung beruht auf einer Reduktion von DTNB (Ellman's Reagenz); es wird die Extinktion des farbigen Anions gemessen.
Thiole weisen im sauren Milieu eine größere Stabilität auf. Um eine weitere Oxidation des Thiols zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu stoppen, wurden die Proben im Eis mit Salzsäure (0,1 N) versetzt. Da die meßbare Thiolkonzentration zwischen 5-50 nMol im Reagenzansatz liegen sollte, wurden darüber liegende Konzentrationen dadurch gleichzeitig in gewünschtem Maße verdünnt. Nach Zusatz von Ellman's Reagenzlösung (0,05 ml angesäuerte, verdünnte Probe + 0,45 ml Ellman's Reagens) wurden die Proben aus dem Eis genommen. Die Messung der Extinktion erfolgte im Extinktionsmaximum bei 412 nm und Raumtemperatur gegen einen Reagenzienleerwert.
Zur Berechnung des Gehalts freier Thiole diente der molare Extinktionskoeffizient des 2-Nitro-5-thiobenzoesäureanions ε =13 600/M cm bei 412 nm.

Dann gilt: $c = \frac{E}{\varepsilon} f$

c = Thiolkonzentration der zu bestimmenden Lösung

E = gemessene Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient

f = Verdünnungsfaktor

3.5.2. Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium bei 0°C in Abhängigkeit von der Zeit

Um zu ermitteln, ob die Lösung der Thiole im Inkubationsmedium bereits während der Vorbereitungszeit unter Eiskühlung einer Oxidation unterliegt, wurde die Abnahme des DTNB-reaktiven Thiolgehalts während einer Zeitspanne von 60 Minuten gemessen. Wie die folgende Tabelle 3.7 zeigt, beträgt der Verlust bei GSH (0,1 mM) 10,2 %, bei Cystein (5 mM) 17,3 % vom Ausgangswert in 60 Minuten.
Da auch eisgekühlte Lösungen nicht stabil sind, empfiehlt sich eine kurzfristige Zubereitung der Lösungen.

3.5.3. Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Um die zu untersuchenden SH-haltigen Substanzen untereinander bezüglich ihrer Stabilität vergleichen zu können, wurde jeweils die Abnahme des DTNB-reaktiven Thiolgehalts im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen während einer Zeitspanne von 60 Minuten gemessen.

3.5.3.1. GSH (0,1 mM)

Wie die nachfolgende Abb.3.8 und Tab.3.8 zeigen, sind nach einer 10 minütigen Inkubation noch 88,4 %, nach 60 Minuten noch 28 % des Thiolgehalts der 0,1 mM Lösung vorhanden.

3.5.3.2. Cystein (5 mM)

Der Thiolgehalt einer 5 mM Lösung von Cystein im Inkubationsmedium beträgt nach einer 10 minütigen Inkubation noch 90,1 %, nach 60 Minuten noch 21,6 % (Abb.3.8, Tab.3.9).

3.5.3.3. Cysteamin-HCl (1 mM, 5 mM, 10 mM)

Cysteamin ist eine äußerst instabile Substanz. Nach 10 minütiger Inkubation sind bei einer 1 mM Lösung noch 45,5 %, bei einer 5 mM Lösung noch 77,4 % und bei einer 10 mM Lösung noch 88,6 % vorhanden (Abb.3.9, Tab.3.10).

3.5.3.4. D-Penicillamin (0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM)

Abb.3.10 und Tab.3.11 zeigen, daß der Thiolgehalt unter Inkubationsbedingungen in 10 Minuten bei 0,1 mM D-Penicillamin auf 71,2 %, bei 0,5 mM auf 91 % abnimmt, bei 5 mM ist in 10 Minuten keine Abnahme meßbar.

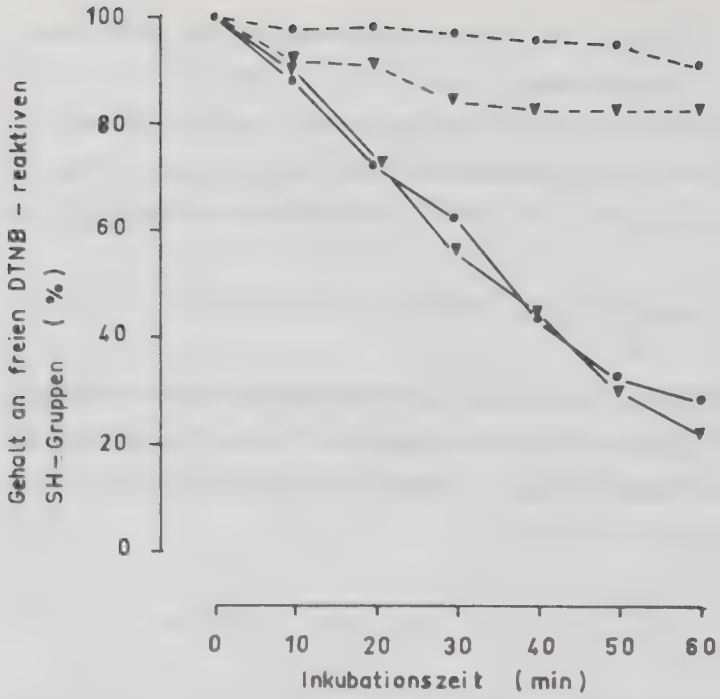
3.5.3.5. N-Acetyl-D-Penicillamin (0,1 mM)

Bei der Bestimmung des Thiolgehalts des N-Acetyl-D-Penicillamins konnte im Inkubationsmedium in Konzentrationen von 0,1 - 1 mM kein quantitativer Ausgangswert gefunden werden (30 - 78 %). Wurde vor dem Umsetzen mit Ellmans Reagens das Albumin mit Metaphosphosäure ausgefällt (0,04 ml Metaphosphosäure 15 % + 0,16 ml Probe) und abzentrifugiert (10 Minuten, 10 000 g), war eine Thiolgehaltsbestimmung im Überstand

möglich, allerdings mit längerer Farbentwicklungszeit (30 min). Im Falle des N-Acetyl-D-Penicillamins stören 2 % Rinderserumalbumin die Thiolbestimmung. Nach Abtrennung des Albumins zeigt die Substanz allerdings eine große Stabilität (Abb.3.11, Tab.3.12). Nach 10 Minuten beträgt der Thiolgehalt noch 98,5 %, nach 60 Minuten noch 81,4 %.

3.5.3.6. Vergleich der Thiole bezüglich ihrer Stabilität

Aufgrund dieser Stabilitätsmessungen kann geschlossen werden, daß unter den gegebenen Inkubationsbedingungen die Stabilität der Thiole in der Reihenfolge: Cysteamin < Cystein < D-Penicillamin < GSH < N-Acetyl-D-Penicillamin zunimmt.



●– – –● L-Cystein (5 mM) bei 0°C

▼– – –▼ GSH (0,1 mM) bei 0°C

●——● L-Cystein (5 mM) bei 37°C

▼——▼ GSH (0,1 mM) bei 37°C

Abb.3.8:

Bestimmung des Thiolgehalts (freie SH-Gruppen) einer Lösung von GSH bzw. Cystein im Inkubationsmedium bei 0°C und unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Einer Lösung von GSH bzw. Cystein im Inkubationsmedium wurde in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Min. errechnet.

Tab.3.7: Bestimmung des Thiolgehalts im Inkubationsmedium bei 0°C in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	GSH (0,1 mM)		Cystein (5 mM)	
	A	B	A	B
0	89,8 ± 0,1 (2)	100	103,1 ± 2,7 (3)	100
10	87,4 ± 2,8 (2)	97,3	94,6 ± 4,3 (3)	92,0
20	88,3 ± 1,8 (2)	98,3	93,6 ± 3,8 (3)	91,1
30	86,7 ± 0,8 (2)	96,5	87,1 ± 4,7 (3)	84,8
40	85,4 ± 0,2 (2)	95,1	84,8 ± 2,4 (3)	82,5
50	84,4 ± 0,1 (2)	94,0	84,8 ± 3,9 (2)	82,5
60	80,6 ± 0,4 (2)	89,8	84,9 ± 1,8 (3)	82,7

Einer eisgekühlten Lösung wurden in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche in Klammern

B : Angabe in % des Thiolgehaltes zum Zeitpunkt 0 min

Tab.3.8: Bestimmung des Thiolgehalts einer Lösung von GSH im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	GSH (0,1 mM)	
	A	B
0	89,5 ± 0,8 (3)	100
10	79,1 ± 1,9 (3)	88,4
20	65,0 ± 1,5 (3)	72,6
30	56,3 ± 1,9 (2)	62,9
40	39,1 ± 2,3 (3)	43,7
50	28,5 ± 2,2 (3)	31,8
60	25,1 ± 1,3 (3)	28,0

Einer 0,1 mM Lösung von GSH im Inkubationsmedium wurde unter Inkubationsbedingungen in 10 minütigen Abständen Proben genommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche in Klammern

B : Angabe in % des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Minuten.

Tab.3.9: Bestimmung des Thiolgehalts einer Lösung von Cystein im Inkubationsmedium unter Inkubationsdingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	Cystein (5 mM)	
	A	B
0	98,9 ± 1,0 (3)	100
10	89,2 ± 1,2 (3)	90,1
20	71,9 ± 5,3 (3)	72,5
30	55,7 ± 5,5 (3)	56,4
40	43,0 ± 7,4 (3)	43,4
50	29,2 ± 5,8 (3)	29,5
60	21,3 ± 4,0 (3)	21,6

Einer Lösung von Cystein (5 mM) im Inkubationsmedium wurde unter Inkubationsbedingungen in 10 minütigem Abstand Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern

B : Angabe in % des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Minuten

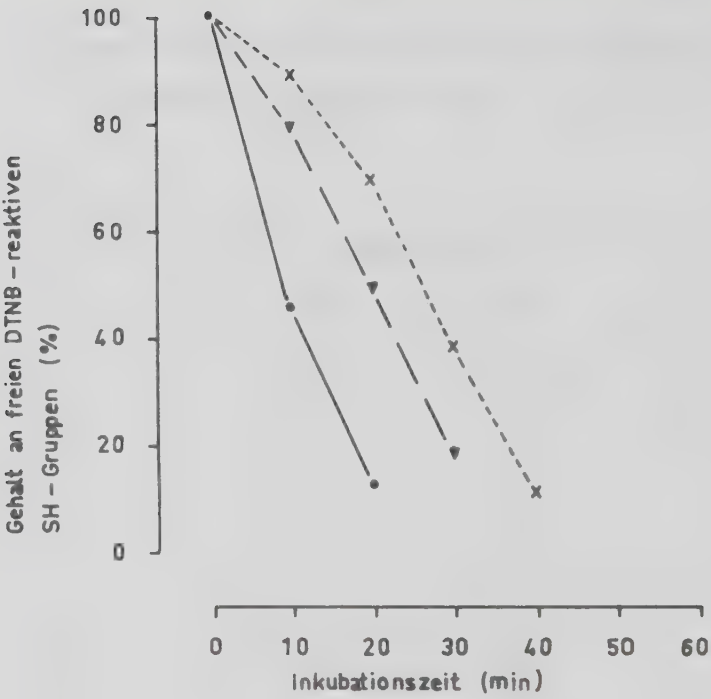


Abb.3.9:

Bestimmung des Thiolgehalts (freie SH-Gruppen) einer Lösung von Cysteamin im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Einer Lösung von Cysteamin im Inkubationsmedium wurde in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Min. errechnet.

Tab.3.10: Bestimmung des Thiolgehalts einer Lösung von Cysteamin im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	Cysteamin 1 mM		5 mM		10 mM	
	A	B	A	B	A	B
0	114 ± 2,5 (3)	100	100,1 ± 1,9 (5)	100	108,6 ± 3,0 (3)	100
10	52,0 ± 3,2 (3)	45,5	78,3 ± 3,8 (5)	78,9	96,3 ± 3,0 (3)	88,6
20	14,2 ± 5,3 (3)	12,4	49,3 ± 6,8 (5)	48,8	65,6 ± 4,6 (3)	69,3
30	-	-	18,8 ± 5,4 (5)	18,4	41,3 ± 2,1 (3)	38,2
40	-	-	-	-	12,1 ± 6,6 (3)	11,3

Einer Lösung von Cysteamin (1 mM, 5 mM, 10 mM) im Inkubationsmedium wurde unter Inkubationsbedingungen in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern

B : Angabe in % des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Minuten

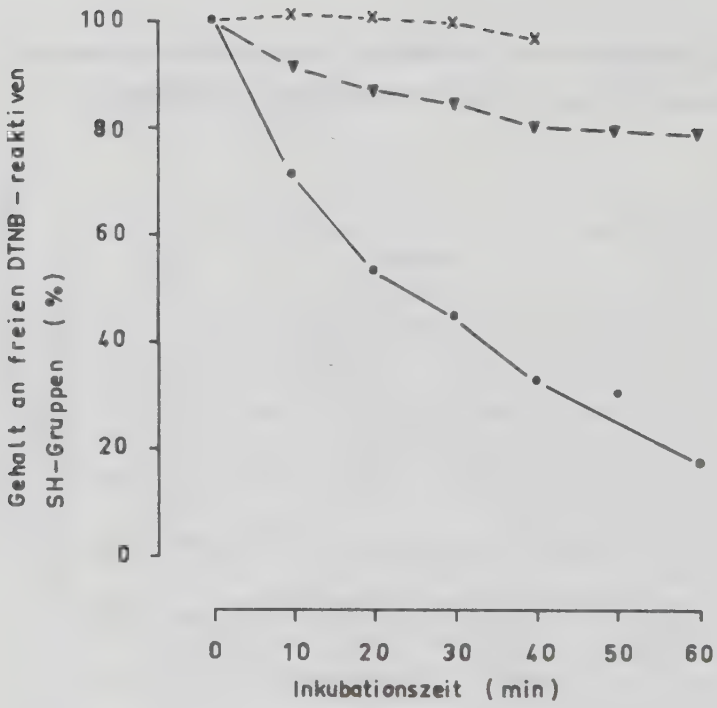


Abb.3.10:

Bestimmung des Thiolgehalts (freie SH-Gruppen) einer Lösung von D-Penicillamin im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Einer Lösung von D-Penicillamin im Inkubationsmedium wurde in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Min. errechnet.

Tab.3.11: Bestimmung des Thiolgehalts einer Lösung von D-Penicillamin im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	D-Penicillamin 0,1 mM		0,5 mM		5 mM	
	A	B	A	B	A	B
0	94,8 ± 1,0 (3)	100	90,1 ± 1,8 (3)	100	106,8 ± 1,2 (2)	100
10	67,8 ± 5,1 (2)	71,2	81,9 ± 1,0 (3)	91,0	107,6 ± 0,6 (2)	100,8
20	50,5 ± 3,7 (3)	53,3	79,2 ± 2,4 (3)	87,9	107,4 ± 1,0 (2)	100,6
30	42,2 ± 0,9 (3)	44,5	76,1 ± 2,3 (3)	84,5	106,4 ± 2,1 (2)	99,6
40	30,8 ± 2,5 (3)	32,5	71,5 ± 2,1 (3)	80,3	102,6 ± 96,1 (2)	96,1
50	28,8 ± 2,3 (3)	30,4	71,3 ± 1,8 (3)	79,2		
60	16,3 ± 1,7 (3)	17,1	69,6 ± 5,1 (2)	78,5		

Einer Lösung von D-Penicillamin (0,1 mM, 0,5 mM, 5 mM) im Inkubationsmedium wurde unter Inkubationsbedingungen in 10 minütigen Abständen Proben entnommen und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern

B : Angabe in % des Thiolgehaltes zum Zeitpunkt 0 Minuten.

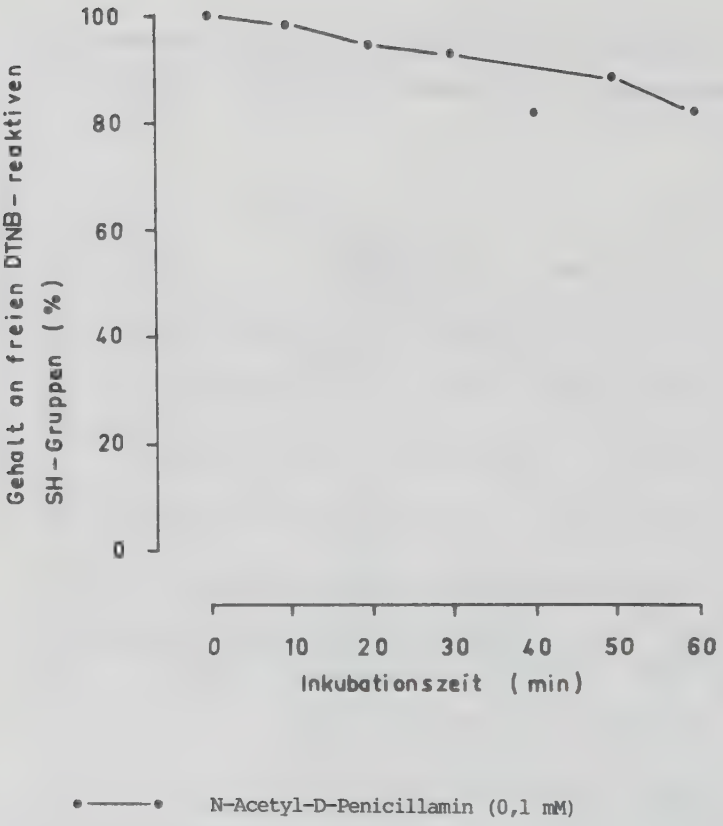


Abb.3.11:

Bestimmung des Thiolgehalts (freie SH-Gruppen) einer Lösung von N-Acetyl-D-Penicillamin im Inkubationmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Einer Lösung von N-Acetyl-D-Penicillamin im Inkubationsmedium wurde in 10 minütigen Abständen Proben entnommen, das Albumin mit Metaphosphosäure ausgefällt, abzentrifugiert und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Min. errechnet.

Tab.3.12: Bestimmung des Thiolgehalts einer Lösung von N-Acetyl-D-Penicillamin im Inkubationsmedium unter Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der Zeit

Zeit (min)	N-Acetyl-D-Penicillamin 0,1 mM	
	A	B
0	100,2 ± 0,4 (2)	100
10	98,7 ± 0,4 (2)	98,4
20	94,8 ± 1,7 (2)	94,5
30	92,9 ± 1,9 (2)	92,7
40	81,8 ± 2,5 (2)	81,7
50	87,9 ± 4,3 (2)	87,9
60	81,6 ± 6,6 (2)	81,4

Einer Lösung von N-Acetyl-D-Penicillamin im Inkubationsmedium wurde unter Inkubationsbedingungen Proben entnommen, das Albumin mit Metaphosphosäure ausgefällt, abzentrifugiert und der Thiolgehalt photometrisch nach Ellman (1959) bestimmt.

A : Angabe in % des Sollwertes, Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche, in Klammern.

B : Angabe in % des Thiolgehalts zum Zeitpunkt 0 Minuten

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1. Bedeutung von GSH für die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte bei Verwendung verschiedener Stimulatoren

4.1.1. Einfluß von GSH und Diamid auf die durch Glucose, Ca-Ionophor A-23187 und Glibenclamid induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

4.1.1.1. Glucose

Als Bezugsgröße des Meßsystems diente die bereits bekannte Thiolabhängigkeit der Insulinsekretion nach Stimulation mit 11,1 mM Glucose (Abdel Hamid, 1983).

Der Basalwert der Insulinfreisetzung in Gegenwart von 5,6 mM Glucose wird durch 11,1 mM Glucose signifikant von 115 µU/ml auf 243 µU/ml gesteigert. Die 10 minütige Wirkung von GSH (0,1 mM) führt zu einer Erhöhung des sezernierten Insulins auf 414 µU/ml. Diamid (0,1 mM) hemmt die Sekretionsleistung der Inseln auf 155 µU/ml (Abb. u. Tab. 4.1).

4.1.1.2. Glibenclamid

Glibenclamid (5 µg/ml) steigert die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion signifikant von 243 µU/ml auf 406 µU/ml in 40 Minuten ($p<0,001$). Weder GSH (0,1 mM) noch Diamid (0,1 mM) beeinflussen die durch Glibenclamid plus Glucose stimulierte Insulinsekretion (Abb.4.1, Tab.4.1).

4.1.1.3. Ca-Ionophor A-23187

Ca-Ionophor A-23187 (50 µg/ml) führt zu einer kräftigen Stimulation der Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose (5,6 mM) und zwar von 115 µU/ml auf 566 µU/ml ($p<0,001$). GSH (0,1 mM) vermag die erzielte Sekretion von Insulin nicht zu steigern, Diamid (0,1 mM) zeigt keine Hemmwirkung (Abb.4.1, Tab.4.1).

Die Wirkung des GSH auf die durch Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion hat bei 0,1 mM ihr Maximum. Auch die Wirkung anderer Stimulatoren der Insulinsekretion wird durch 0,1 mM GSH verstärkt (Ammon & al., 1984a). Neben den hier untersuchten Stimulatoren Ca-Ionophor und Glibenclamid zeigen auch Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP eine durch 0,1 mM GSH nicht zu steigernde Wirkung auf die Insulinsekretion (Abdel Hamid, 1983). Da es denkbar wäre, daß bei manchen Stimulatoren der Insulinsekretion eine andere Konzentration des GSH die maximal wirksame ist, soll bei oben genannten Stimulatoren ein Konzentrationsbereich von 0,05 - 2 mM GSH getestet und wie für Glucose (Abdel Hamid, 1983) eine Dosis-Wirkungsbeziehung erstellt werden.

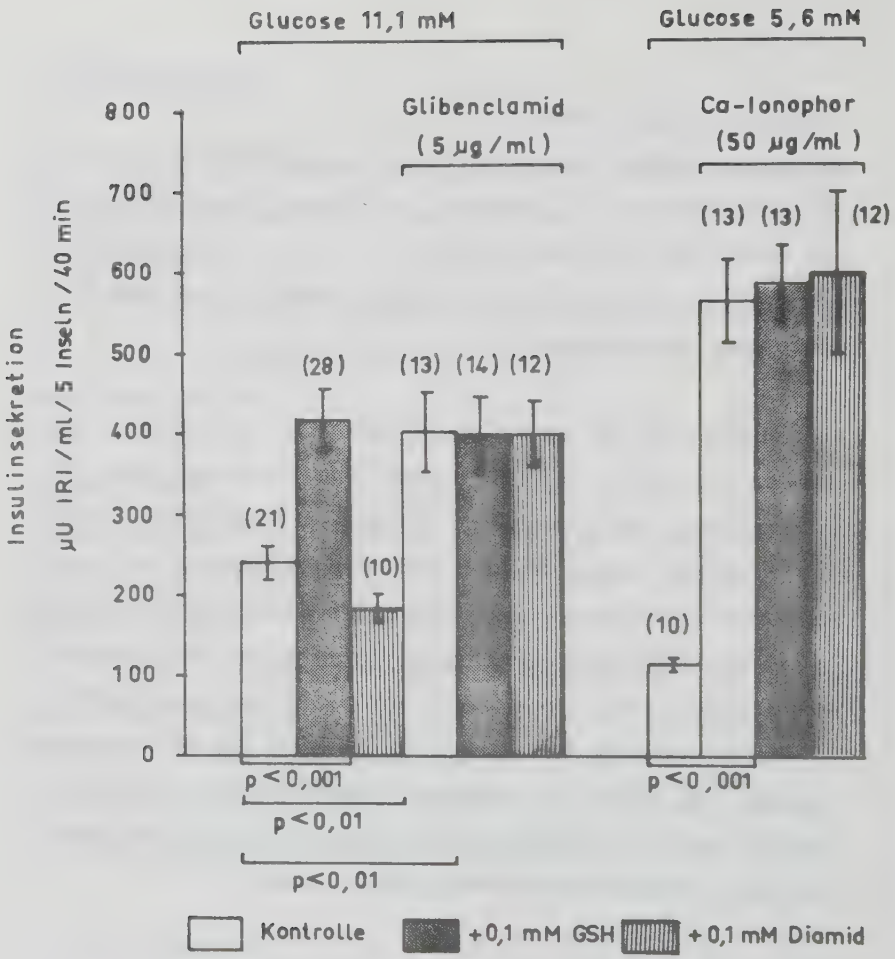


Abb.4.1:

Einfluß von GSH (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch Glucose, Ca-Ionophor und Glibenclamid induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Inkubation: je 5 Inseln 40 Min. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (5,6 mM, 11,1 mM) + Stimulator mit und ohne Diamid; Zugabe des GSH ab 30. Min.

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.1:
Einfluß von GSH (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) auf die durch Glucose (11,1 mM), Ca-Ionophor (50 µg/ml) in Gegenwart von substimulatorischer Glucose (5,6 mM) und Glibenclamid (5 µg/ml) in Gegenwart von stimulatorischer Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

		GSH (0,1 mM)	Diamid (0,1 mM)
Glucose (11,1 mM)	243 ± 18 (21) A	414 ± 37 (28) B	155 ± 16 (10) C
Glucose (5,6 mM) + Ca-Ionophor (50 µg/ml)	566 ± 53 (13) D	586 ± 45 (13) E	599 ± 99 (12) F
Glucose (11,1 mM) + Glibenclamid (5 µg/ml)	406 ± 46 (13) G	403 ± 47 (14) H	403 ± 39 (12) I

Je 5 Inseln wurden 40 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (5,6 mM, 11,1 mM) und dem Stimulator mit und ohne Diamid inkubiert. GSH wurde ab der 30. Minute zugesetzt.

Mittelwert ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Kontrollwert: Glucose (5,6 mM): 115 ± 8 (10)

Stat. Auswertung: AB: $p < 0{,}001$, AC: $p \ll 0{,}01$
DE, DF, GH, GI: n.s.

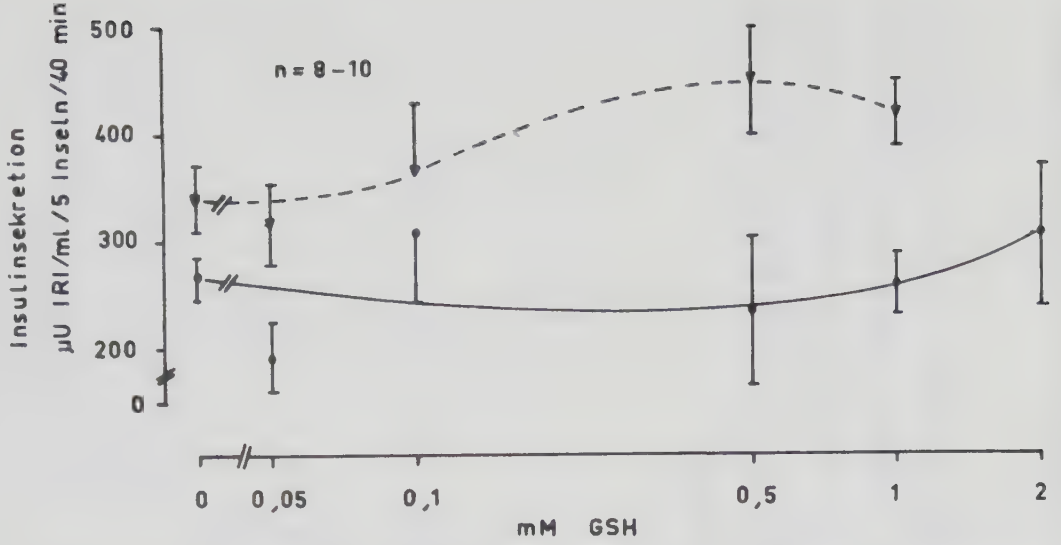
4.1.2. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Ca-Ionophor A-23187, Glibenclamid, Glucagon, Isoprenalin und db-cAMP induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

4.1.2.1. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Ca-Ionophor A-23187 induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Ca-Ionophor A-23187 (50 µg/ml) stimuliert die Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose (5,6 mM) signifikant von 117 µU/ml auf 267 µU/ml ($p<0,001$). GSH (0,05 - 1 mM) erzielt bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Erhöhung der durch Ca-Ionophor A-23187 induzierten Insulinsekretion (Abb. u. Tab.4.2).

4.1.2.2. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Glibenclamid plus Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Die durch Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion wird durch Glibenclamid (5 µg/ml) signifikant von 203 µU/ml auf 341 µU/ml erhöht ($p<0,01$). Durch verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,05-2 mM) zeigt sich keine Änderung der Insulinsekretion (Abb.u. Tab.4.2).



●———● Glucose (5,6 mM) + Ca-Ionophor (50 µg/ml) ▼- - - -▼ Glucose (11,1 mM) + Glibenclamid (5 µg/ml)

Abb.4.2:

Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,05–2 mM) auf die durch Ca-Ionophor und Glibenclamid induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (5,6 mM, 11,1 mM) + Stimulator; Zugabe des GSH ab der 30. Min.

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

4.1.2.3. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Glucagon induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Glucagon (5 µg/ml) bewirkt in dieser Versuchsreihe in Gegenwart von 5,6 mM Glucose keine signifikante Stimulation der Insulinsekretion (von 117 µU/ml auf 145 µU/ml). Wie Abb.4.3 und Tab.4.2 zeigen, führt GSH (0,05-2 mM) bei 1 mM zu einer signifikanten Steigerung der durch Glucagon sezernierten Insulinmenge (301 µU/ml, $p<0,05$). Kleinere GSH-Konzentrationen sind ohne Wirkung.

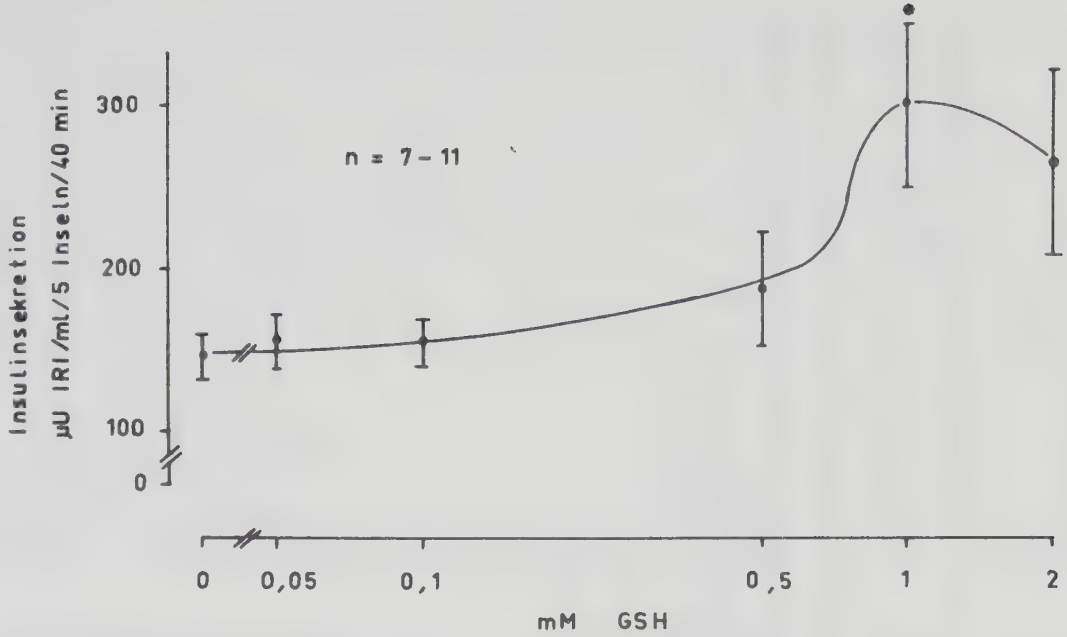


Abb.4.3:

Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,05-2 mM) auf die durch Glucagon induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (5,6 mM) + Stimulator; Zugabe des GSH ab der 30. Min.

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

4.1.2.4. Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen auf die durch Isoprenalin und db-cAMP induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Isoprenalin (1 µM) und db-cAMP (1 mM) stimulieren die Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose (5,6 mM) signifikant. Der Basalwert wird durch Isoprenalin von 117 µU/ml auf 227 µU/ml ($p<0,05$), von db-cAMP von 137 µU/ml auf 332 µU/ml erhöht ($p<0,01$). Im Konzentrationsbereich von 0,05-2 mM GSH konnte keine synergistische Wirkung der Substanzen auf die Insulinsekretion gefunden werden (Tab.4.2). Abb.4.4 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse.

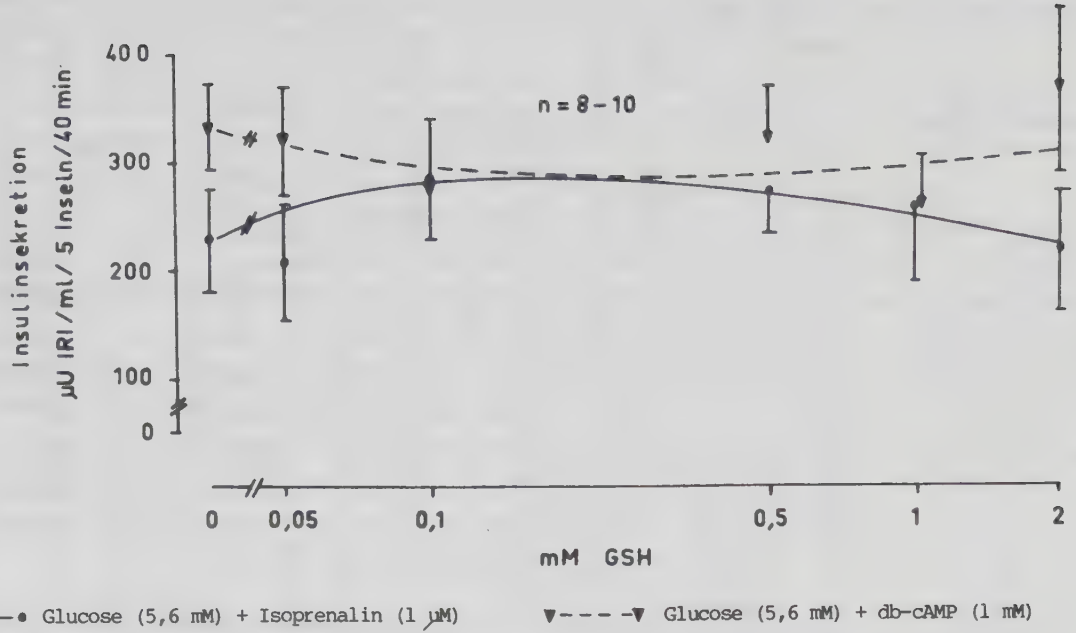


Abb.4.4:

Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,05–2 mM) auf die durch Isoprenalin und db-cAMP induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (5,6 mM) + Stimulator; Zugabe des GSH ab der 30. Min.

Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.2:

Einfluß von verschiedenen GSH-Konzentrationen (0,05-2,0 mM) auf die durch Glucagon (5 µg/ml), Isoprenalin (1 µM), db-cAMP (1 mM) und Ca^{2+}-Ionophor A 23187 (50 µg/ml) in Gegenwart von substimulatorischer Glucose (5,6 mM) sowie durch Glibenclamid (5 µg/ml) in Gegenwart von stimulatorischer Glucose (11,1 mM) induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte.

	GSH (mM)					
	0,0	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0
Glucose (5,6 mM) + Glucagon (5 µg/ml)	A 145 ± 10 (7)	B 155 ± 15 (9)	C 154 ± 14 (11)	D 187 ± 35 (8)	E 301 ± 49 (9)	F 264 ± 59 (9)
Glucose (5,6 mM) + Isoprenalin (1 µM)	G 227 ± 46 (10)	H 205 ± 53 (10)	I 283 ± 60 (9)	K 272 ± 37 (9)	L 256 ± 71 (8)	M 213 ± 54 (6)
Glucose (5,6 mM) + db-cAMP (1 mM)	N 332 ± 36 (10)	O 319 ± 51 (9)	P 278 ± 49 (10)	Q 318 ± 50 (9)	R 258 ± 48 (10)	S 365 ± 76 (9)
Glucose (5,6 mM) + Ca^{2+}-Ionophor (50 µg/ml)	a 267 ± 18 (9)	b 190 ± 33 (8)	c 306 ± 62 (9)	d 234 ± 68 (10)	e 259 ± 27 (9)	f 305 ±65 (9)
Glucose (11,1 mM) + Glibenclamid (5 µg/ml)	g 341 ± 29 (10)	h 317 ± 38 (10)	i 363 ± 61 (9)	k 452 ± 51 (10)	l 319 ± 29 (10)	-

Je 5 Inseln wurden 40 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin, Glucose (5,6 mM od. 11,1 mM) und dem Stimulator inkubiert. GSH wurde ab der 30. Minute zugesetzt.

Mittelwert IRI/ml/5 Inseln/40 Min. ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Kontrollwert: Glucose (5,6 mM): 117±15 (7) für A-F, a-f; 137±38 (8) für G-S; 11,1 mM: 203±27 (11)

Stat. Auswertung: AB, AC, AD, AF, GH, GI, GK, GL, GM, NO, NP, NQ, NR, NS, ab, ac, ad, ae, af, gh, gi, gk, gl: n.s. ; AE: $p < 0,05$

4.2. Einfluß von L-Cystein und Cysteinderivaten auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

4.2.1. Einfluß von verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

In Vorversuchen wurde ermittelt, daß L-Cystein in Konzentrationen von 0,05-2 mM keinen Einfluß auf die durch Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion hat. Bei der Untersuchung der Wirkung von 3-7 mM L-Cystein auf die glucosestimulierte Insulinsekretion ergab sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung.

In Abwesenheit von L-Cystein ist die sezernierte Insulinmenge durch 11,1 mM Glucose im Vergleich zu der bei substimulatorischer Glucose (2,8 mM) ermittelten signifikant von 49 µU/ml auf 101 µU/ml erhöht ($p<0.01$).

In Gegenwart von stimulatorischer Glucose (11,1 mM) wird die Insulinsekretion durch 3 mM L-Cystein auf 176 µU/ml erhöht ($p<0,01$). Dosisabhängig erfolgt eine weitere Steigerung der sezernierten Insulinmenge durch 4 mM L-Cystein auf 200 µU/ml ($p<0,001$) durch 6 mM und 7 mM auf 263 µU/ml und 292 µU/ml ($p<0,001$).

Wie Abb.4.5 und Tab.4.3 zeigen, stimuliert L-Cystein für sich die Insulinsekretion in Gegenwart von 2,8 mM Glucose, allerdings erst ab 4 mM, von 49 µU/ml auf 82 µU/ml ($p<0,05$), mit einer weiteren Zunahme des sezernierten Insulins auf 132 µU/ml sowohl durch 6 mM wie durch 7 mM L-Cystein ($p<0,05$, $p<0,01$).

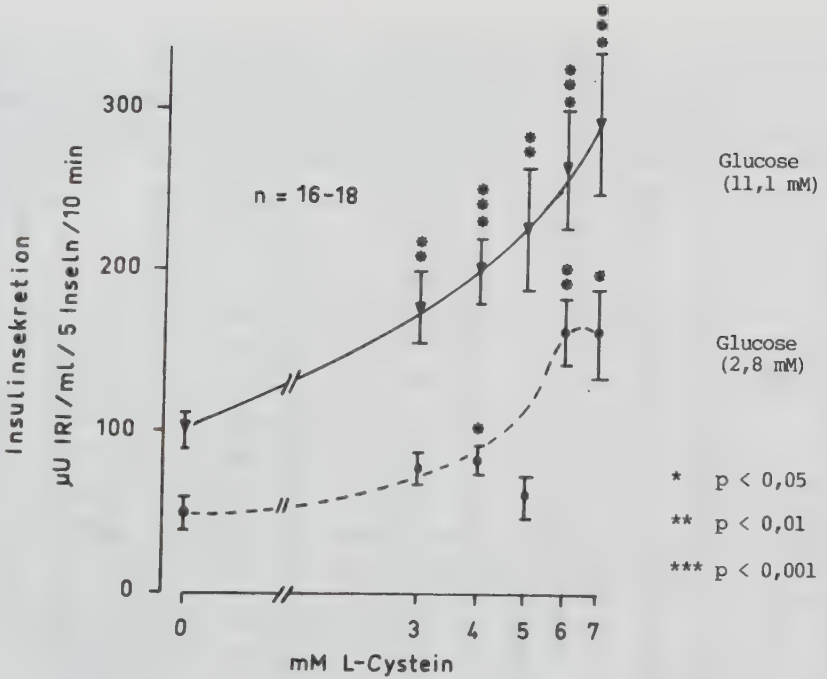


Abb.4.5:

Einfluß von verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen (3-7 mM) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte
Inkubation: je 5 Inseln 30 Min. in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (2,8 mM, 11,1 mM), dann 10 Min. in 1 ml des gleichen Mediums mit und ohne Thiol
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.3:
Einfluß von verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen (3,0-7,0 mM) auf die durch Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

	L-Cystein (mM)					
	0,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
Glucose (2,8 mM)	A 49 ± 10 (12)	B 76 ± 10 (17)	C 82 ± 10 (17)	D 60 ± 12 (18)	E 132± 20 (17)	F 132 ± 27 (18)
Glucose (11,1 mM)	G 101 ± 11 (17)	H 176 ± 22 (17)	I 200 ± 19 (17)	K 226 ± 39 (16)	L 263 ± 36 (16)	M 292 ± 44 (16)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer- Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit und ohne verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen gesetzt und 10 Minuten weiterinkubiert. Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (µU IRI/ml/5 Inseln/10 Minuten).

Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

Stat. Auswertung: AB, AD: n.s., AC, AF: $p \leq 0,05$, AE: $p < 0,01$
GH, GK: $p < 0,01$, GI, GL, GM: $p < 0,001$

4.2.2. Einfluß von verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Die Stimulation der Insulinsekretion durch 11,1 mM Glucose ist deutlich, nämlich von 53 µU/ml in Gegenwart von 2,8 mM Glucose auf 92 µU/ml ($p<0,001$).

Bereits 0,1 mM Cysteamin erzielen eine signifikante Steigerung der durch Glucose (11,1 mM) stimulierten Insulinsekretion von 92 µU/ml auf 163 µU/ml ($p<0,001$). Eine weitere Dosiserhöhung ergibt keine weitere dosisabhängige Steigerung der Menge sezernierten Insulins. Abb.4.6 zeigt von 1 mM-3 mM Cysteamin ein Plateau (172 µU/ml, $p<0,05-0,01$).

Cysteamin hat in Gegenwart von 2,8 mM Glucose im gesamten Konzentrationsbereich (0,1-3 mM) keinen Einfluß auf die Insulinsekretion (Abb.4.6, Tab.4.4).

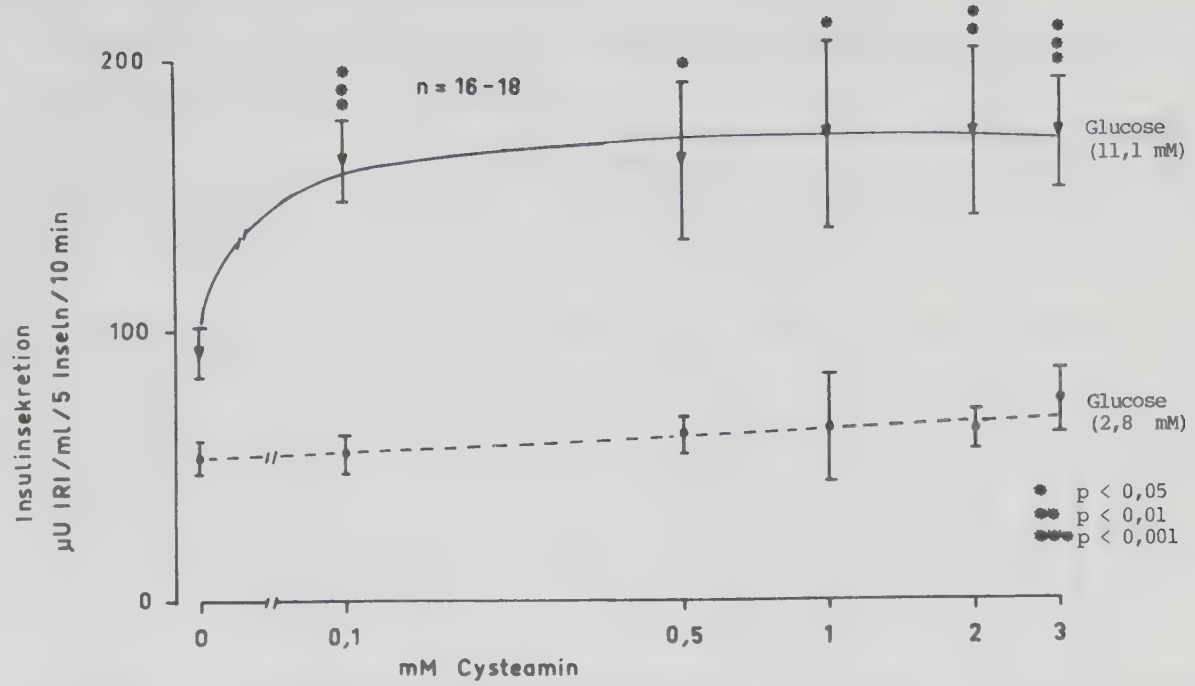


Abb.4.6:

Einfluß von verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen (0,1-3 mM) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte
Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (2,8 mM, 11,1 mM), dann 10 Min. in 1 ml des gleichen Mediums mit und ohne Thiol
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.4:
Einfluß von verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen (0,1-3,0 mM) auf die durch Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

	Cysteamin (mM)					
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0
Glucose (2,8 mM)	A 53 ± 6 (17)	B 55 ± 7 (18)	C 62 ± 6 (18)	D 64 ± 20 (18)	E 63 ± 7 (16)	F 74 ± 12 (18)
Glucose (11,1 mM)	G 92 ± 9 (18)	H 163 ± 16 (18)	I 162 ± 30 (16)	K 172 ± 34 (18)	L 171 ± 30 (18)	M 171 ± 21 (16)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit und ohne verschiedenen Cysteamin-Konzentrationen gesetzt und 10 Minuten weiterinkubiert. Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (µU IRI/ml/5 Inseln/10 Minuten).

Mittelwert ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern, Basalwert (0 mM Glucose): 30 ± 4 (17)

Stat. Auswertung: AB, AC, AD, AE, AF: n.s.
GH, GM: $p<0,001$, GI, GK: $p<0,05$, GL: $p<0,01$

4.2.3. Einfluß von verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Die durch 11,1 mM Glucose freigesetzte Insulinmenge (59 µU/ml) wird durch 0,5 mM D-Penicillamin auf 87 µU/ml gesteigert ($p<0,05$). Eine Dosiserhöhung auf 1 mM D-Penicillamin ergibt keine weitere Wirkungssteigerung (86 µU/ml, $p<0,05$), bei 2 mM scheint das Wirkungsmaximum überschritten zu sein (75 µU/ml, n.s.).

Eine Eigenwirkung auf die Insulinsekretion unabhängig von der Stimulation durch Glucose scheint D-Penicillamin nicht zu haben, da sich in Gegenwart von 2,8 mM Glucose keine signifikanten Unterschiede ergeben. Durchschnittlich werden 44 µU/ml ermittelt (Abb.4.7, Tab.4.5).

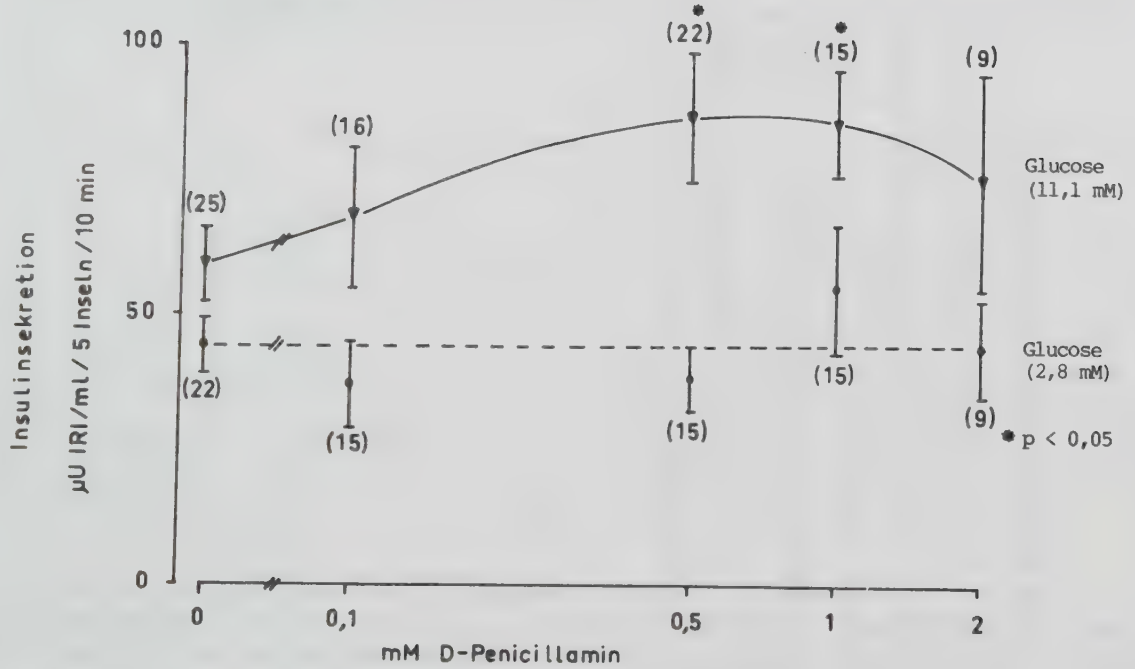


Abb.4.7:

Einfluß von verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte
Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (2,8 mM, 11,1 mM), dann 10 Min. in 1 ml des gleichen Mediums mit und ohne Thiol
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.5:

Einfluß von verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen (0,1-2,0 mM) auf die durch Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte.

	D-Penicillamin (mM)				
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0
Glucose (2,8 mM)	A 44 ± 5 (22)	B 37 ± 8 (15)	C 38 ± 6 (15)	D 55 ± 12 (15)	E 44 ± 9 (9)
Glucose (11,1 mM)	F 59 ± 7 (25)	G 68 ± 13 (16)	H 87 ± 12 (22)	I 86 ± 10 (15)	K 75 ± 20 (9)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit und ohne verschiedenen D-Penicillamin-Konzentrationen gesetzt und 10 Minuten weiterinkubiert. Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (IRI/ml/5 Inseln/10 Min.).

Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

Stat. Auswertung: AB, AC, AD, AE: n.s.

FG, FK: n.s.; FH, FI: $p < 0,05$

4.2.4. Einfluß von verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

In Abwesenheit des Thiols wird die Insulinsekretion durch 11,1 mM Glucose im Vergleich zum Kontrollwert bei 2,8 mM Glucose signifikant von 47 µU/ml auf 69 µU/ml gesteigert ($p<0,05$).

Niedrige Konzentrationen (0,1 mM, 0,5 mM) der Substanz haben keinen Einfluß auf die Insulinsekretion unabhängig von der Glucosekonzentration. Dagegen zeigt sich bei 1 mM und 2 mM N-Acetyl-D-Penicillamin ein signifikanter synergistischer Effekt mit Glucose (11,1 mM) auf die Insulinfreisetzung (Steigerung von 69 µU/ml auf 102 µU/ml und 122 µU/ml, $p<0,05$). Bei 3 mM des Thiols scheint das Wirkungsmaximum überschritten (73 µU/ml, n.s.).

In Gegenwart von 2,8 mM Glucose stimuliert N-Acetyl-D-Penicillamin in Konzentrationen zwischen 1 mM und 3 mM die Insulinsekretion per se. Der Basalwert 47 µU/ml wird auf 75 µU/ml durch 1 mM ($p<0,05$) und auf 94 µU/ml durch 2 mM des Thiols ($p<0,05$) erhöht. 3 mM ergeben keine weitere Zunahme der freigesetzten Insulinmenge (90 µU/ml, $p<0,001$). Die Ergebnisse sind in Abb.4.8 und Tab.4.6 dargestellt.

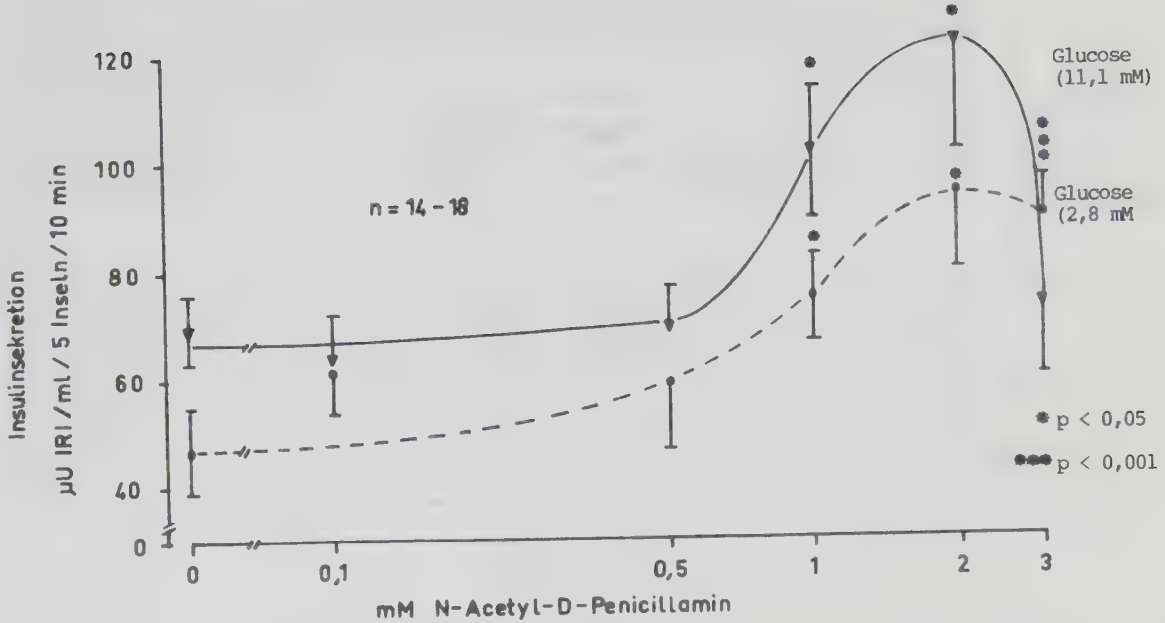


Abb.4.8:

Einfluß von verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen (0,1-3 mM) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte
Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (2,8 mM, 11,1 mM), dann 10 Min. in 1 ml des gleichen Mediums mit und ohne Thiol
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.6:
Einfluß von verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen (0,1-3,0 mM) auf die durch Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte.

	N-Acetyl-D-Penicillamin (mM)					
	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	3,0
Glucose (2,8 mM)	A 47 ± 8 (14)	B 63 ± 9 (17)	C 59 ± 12 (17)	D 75 ± 8 (18)	E 94 ± 14 (17)	F 90 ± 7 (16)
Glucose (11,1 mM)	G 69 ± 7 (14)	H 62 ± 8 (17)	I 70 ± 8 (17)	K 102 ± 11 (15)	L 122 ± 19 (17)	M 73 ± 13 (18)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit und ohne verschiedenen N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentrationen gesetzt. Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (IRI/ml/5 Inseln/10 Min.).

Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuche in Klammern

Stat. Auswertung: AB, AC: n.s.; AD: $p<0,05$; AE: $p<0,05$; AF: $p<0,001$
GH, GI, GM: n.s.; GK: $p<0,05$; GL: $p<0,05$

4.3. Einfluß von Disulfiden auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

Um die Bedeutung der SH-Gruppe bei der Beeinflussung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch Thiole abzusichern und eine durch andere Strukturkomponenten verursachte Wirkung auszuschließen, wurden von den unter 4.2. beschriebenen Thiolen - soweit erhältlich - die entsprechenden Disulfide bzgl. ihrer Wirkung auf die Insulinfreisetzung untersucht. Es wurde jeweils eine Konzentration eingesetzt, bei der das Thiol deutlich steigernden Effekt auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion zeigte.

Wie Abb.4.9 und Tab.4.7 zeigen, haben weder L-Cystin (5 mM) noch Cystamin (2 mM) und D-Penicillamin-disulfid (0,5 mM) einen Einfluß auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 2,8 mM Glucose.

Bei Stimulation der Insulinsekretion durch 11,1 mM Glucose verändern Cystamin und D-Penicillamin-disulfid die Insulinfreisetzung nicht, während L-Cystin die sezernierte Insulinmenge signifikant von 101 µU/ml auf 68 µU/ml erniedrigt.

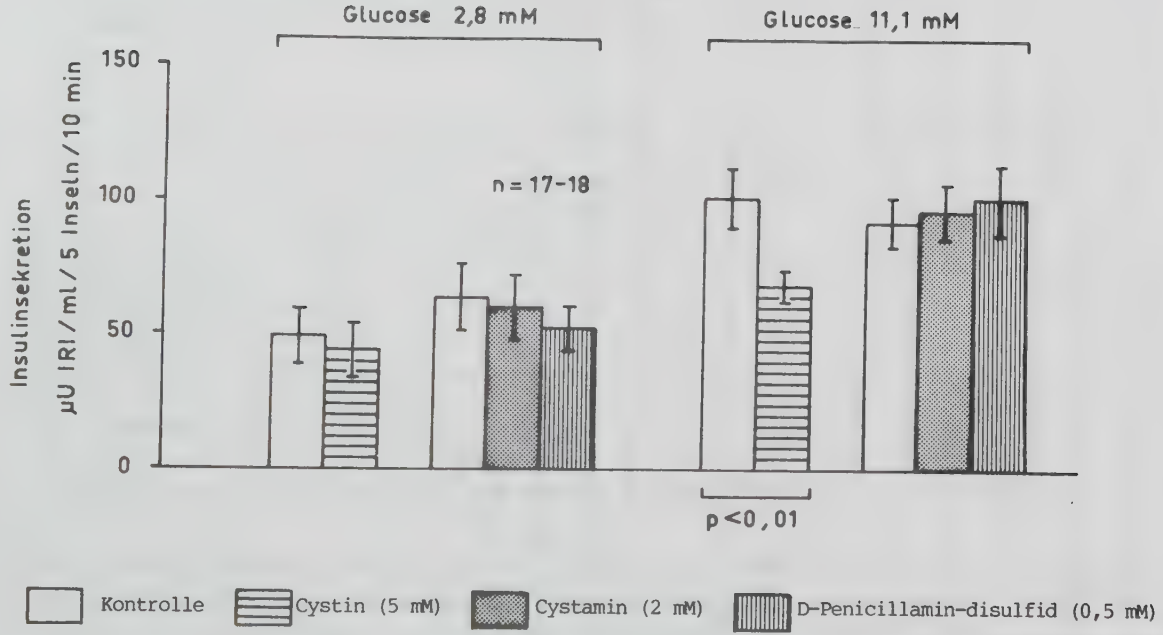


Abb.4.9:

Einfluß von verschiedenen Disulfiden (L-Cystin, Cystamin und D-Penicillamin-disulfid) auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte
Inkubation: je 5 Inseln in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer + Albumin (2 %) + Glucose (2,8 mM, 11,1 mM), dann 10 Min. in 1 ml des gleichen Mediums mit und ohne Disulfiden
Mittelwert ± SEM, n = Anzahl der Versuche

Tab. 4.7:
Einfluß von verschiedenen Disulfiden (Cystin, Cystamin, D-Penicillamin-disulfid) auf die durch Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) induzierte Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln der Ratte

	Cystin (mM)		Cysteamin (mM)		D-Penicillamin-disulfid (mM)	
	0,0	5,0	0,0	2,0	0,0	0,5
Glucose (2,8 mM)	A 49 ± 10 (12)	B 44 ± 11 (18)	C 64 ± 12 (18)	D 60 ± 12 (18)	E 64 ± 12 (18)	F 52 ± 8 (18)
Glucose (11,1 mM)	G 101 ± 11 (17)	H 68 ± 6 (17)	I 92 ± 9 (18)	K 96 ± 10 (17)	L 92 ± 9 (18)	M 101 ± 13 (18)

Je 5 Inseln wurden 30 Minuten in 1 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatpuffer mit 2 % Albumin und Glucose (2,8 mM, 11,1 mM) inkubiert. Anschließend wurde das Netzgefäß mit den Inseln in 1 ml des gleichen Puffers mit und ohne Disulfiden gesetzt, Gemessen wurde die während der 10 Minuten freigesetzte Insulinmenge (µU IRI/ml/5 Inseln/10 Minuten).

Mittelwert ± SEM; Anzahl der Versuch in Klammern

Stat. Auswertung: AB, CD, EF, IK, LM: n.s.
GH: $p < 0,01$

5. DISKUSSION

5.1. Thiolabhängige und thiolunabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion

5.1.1. Ca-Ionophor A23187

Ionophore erleichtern den passiven Transport von Ionen durch Membranen, indem sie entweder als Carrier oder als Porenbildner wirken (McLaughlin & Eisenberg, 1975). Sie dienen daher als Hilfsmittel zur Untersuchung zahlreicher biologischer, von Ionenbewegungen abhängiger Phänomene (Pressman, 1976). Bei dem Ionophor A 23187 handelt es sich um ein von Steptomyces gebildetes Antibioticum, welches hohe Spezifität für Ca(2+)-Ionen aufweist (Reed & Lardy, 1972), aber auch monovalente Kationen transportiert (Pfeiffer & al., 1978). Voraussetzung des Transports ist die Lipophilie und die Komplexbildung der Substanz mit Ca(2+)-Ionen im Verhältnis 2:1.

In Übereinstimmung mit der Bedeutung des Calciumeinstroms beim Mechanismus der Insulinsekretion wurde mit Ca-Ionophor A 23187 eine Stimulation der Insulinsekretion gefunden. Im isolierten, perfundierten Pankreas von Hund (Conaway & al., 1976) und Ratte (Somers & al., 1976) erzielte A 23187 bei substimulatorischer Glucose eine monophasische Insulinsekretion, welche durch extrazellulären Ca(2+)-Entzug verhindert wird. Somers & al. zeigten außerdem, daß die insulinsekretorische Wirkung des Ionophors durch Verapramil hemmbar ist.

Neben der Calciumtranslokation werden von Ca-Ionophoren weitere Angriffspunkte im Insulinsekretionsmechanismus berichtet. Hellman & al. (1975a) fanden, daß der Ionophor X-537-A die Stabilität der Insulinsekretionsgranula vermindert; Somers & al. (1979) konnte mit Hilfe von

Zeitrafferstudien in Inseln nachweisen, daß Ca-Ionophor A 23187 wie Glucose zu kontraktionsähnlichen Bewegungen im Mikrotubulus-Mikrofilamentsystem führt.

Bei hohen Glucosekonzentrationen wirkt A 23187 hemmend auf die Insulinsekretion, wahrscheinlich weil eine hohe intrazelluläre Ca(2+)-Konzentration die B-Zellfunktion stört (Hellman, 1975b).

Bei isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte stimuliert A 23187 signifikant sowohl die Insulinsekretion als auch die 45Ca(2+)-Aufnahme (Ammon & al., 1983). Das Thioloxidans DIP hemmt keine der beiden Wirkungen. Es wird angenommen, daß die der Calciumaufnahme folgenden Schritte im Sekretionsmechanismus unabhängig vom intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten sind. Der durch den Ionophor vermittelte Calciumeinstrom unterscheidet sich im Mechanismus von der Calciumaufnahme über den voltabhängigen Calciumkanal, wie die unterschiedliche Beeinflussung durch das intrazelluläre Thioloxidans DIP vermuten läßt.

In Einklang mit diesen Befunden bewirkt auch Diamid keine Hemmung der durch A 23187 stimulierten Insulinsekretion (Abb. 4.1, Tab.4.1). Exogenes GSH erzielt bei keiner der getesteten Konzentrationen eine Steigerung des sezernierten Insulins (Abb.4.2, Tab.4.2).

Dies bekräftigt, daß die durch Ca-Ionophor A 23187 stimulierte Calciumaufnahme und Insulinsekretion thiolunabhängig sind .

5.1.2. Sulfonylharnstoffe

5.1.2.1. Allgemeine Darstellung zum Wirkungsmechanismus

Obwohl auf verschiedensten Wegen eine Klärung des Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe gesucht worden ist, konnte bisher kein einheitliches Konzept gefunden werden.

Da die insulinsekretorische Wirkung der Glucose von ihrem Metabolismus

in der B-Zelle abhängt, erhob sich die Frage, ob Sulfonylharnstoffe den Glucosestoffwechsel und Energieumsatz beeinflussen. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitgruppen sind aber z.T. widersprüchlich. Eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme bei niedriger Glucose durch Glibenclamid und Tolbutamid, eine Hemmung diese Parameters bei hoher Glucose durch Tolbutamid wurde von Stork & al. (1969) gemessen. Die Bildung von Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat war durch Tolbutamid in Studien von Montague & Taylor (1969) leicht erhöht. Ashcroft & al. (1970) erhielten durch Tolbutamid eine Zunahme der Glucoseoxidation und Lactatbildung. Befunde von Ammon & al. (1972b) zeigen, daß in Gegenwart von 16,7 mM Glucose durch Tolbutamid kein Anstieg der $^{14}CO_2$-Produktion von 14-C-1 oder 14-C-6 markierter Glucose erkennbar ist. Kawazu & al. (1980) berichten, daß durch Glibenclamid, Gliclazid und Tolbutamid weder eine Erhöhung der Oxidation von Glucose, Pyruvat oder Palmitat noch des Gehalts an ATP und, im Einklang mit Panten (1973) und Ammon (1975), NAD(P)H erfolgt. Ob also eine Steigerung des Stoffwechsels im Mechanismus der Insulinsekretion durch Sulfonylharnstoffe von Bedeutung ist, bleibt umstritten, wird aber derzeit als wenig wahrscheinlich angesehen.

Als weiterer hypothetischer Angriffspunkt der Sulfonylharnstoffe wurde die Beeinflussung des cAMP-Systems betrachtet. Der Anstieg des cAMP-Spiegels durch Tolbutamid (Charles & al., 1976) kann sowohl durch die Aktivierung der Adenylatcyclase (Levey & al., 1972) wie auch durch die Hemmung der Phosphodiesterase (Goldfine & al., 1971; Ashcroft & al., 1972) erklärt werden. Inwieweit der Anstieg des cytosolischen Calciums für die cAMP-Zunahme durch Tolbutamid verantwortlich ist (Valverde & al., 1979), bleibt offen. Kawazu & al. (1980) sieht in einem Vergleich von Theophyllin mit Tolbutamid hinsichtlich ihrer Beeinflussung von

Insulinsekretion, Metabolismus endogener Nährstoffe, ATP-Gehalt, 45Ca- und 86Rb-Aufnahme eine Unterstützung dieser Theorie der indirekten, Ca(2+)-vermittelten cAMP-Stimulierung.

Über den Einfluß von Tolbutamid auf die Caliumfluxe herrscht allgemein Übereinstimmung. Tolbutamid stimuliert die 45Ca-Aufnahme in Langerhansschen Inseln bei Maus (Hellman, 1977) und Ratte (Henquin, 1980a). Da Tolbutamid nicht in die Zelle aufgenommen wird, wohl aber an die B-Zellmembran bindet (Hellman & al., 1971), resultiert die insulinsekretorische Wirkung der Sulfonylharnstoffe möglicherweise aus einer Interaktion der Substanzen mit der Membran, als deren Folge die Änderung von Ionenfluxen angesehen werden kann. Hinweise auf diese Ionenbewegungen durch die Membran gab bereits der frühe Befund von Dean & Matthews (1968), daß Tolbutamid zu einer Depolarisation der B-Zelle führt.

Es existieren derzeit zwei Theorien, wie der Calciumeinstrom durch Sulfonylharnstoffe hervorgerufen wird:

1) Tolbutamid wirkt wie Glucose, d.h. führt zum Calciumeinstrom über den voltabhängigen Calciumkanal (Henquin, 1980a; Hellman, 1981). Von Boschero & al. (1979) und Henquin (1980a) wurde berichtet, daß Tolbutamid den Rb-Efflux in Abwesenheit und Anwesenheit von niedriger Glucose hemmt. Ob dieser Mechanismus allerdings auch für andere Sulfonylharnstoffe gilt, müßte in weiteren Studien geprüft werden.

2) Der durch Sulfonylharnstoffe erzielte Calciumeinstrom beruht auf einer Ionophorwirkung der Substanzen (Couturier & Malaisse, 1980; Kawazu & al., 1980). In der Arbeitsgruppe um Malaisse wurde mit einem künstlichen System gezeigt, daß blutzuckersenkende Sulfonylharnstoffe wie Gliclazid die Translokation von Calcium in hydrophobes Medium bewirken und dieser Effekt von Ca-Ionophor A 23187 gesteigert wird (An-

janeyulu & al., 1980). Unterstützt wird diese Theorie durch Kernresonanz- und Konformationsanalysen, welche zeigen, daß Sulfonylharnstoffe zusammen mit A 23187 und Ca(2+)-Ionen Hybridkomplexe bilden (Deleers & al., 1981). Derartige Komplexbildung zwischen Sulfonylharnstoffen und nativen Membranionophoren könnte den Ca(2+)-Transport durch die B-Zellmembran auslösen.

Ein Vergleich der Wirkungen von Tolbutamid und A 23187 auf den Ca(2+)-Efflux scheint dieser Theorie zu widersprechen. Bei calciumfreiem Medium wird der Ca(2+)-Efflux bei Tolbutamid, nicht aber bei A 23187, verhindert, außerdem hängt die Wirkung des Sulfonylharnstoffs im Gegensatz zum A 23187 von der Anwesenheit von K(+) ab (Hellman, 1982).

Die Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe wird dadurch kompliziert, daß obengenannte Untersuchungen nicht alle Substanzen erfassen, sondern meist nur mit Tolbutamid durchgeführt wurden. Nun gibt es aber Hinweise dafür, daß sich Tolbutamid bezüglich einiger Parameter von z.B. Glibenclamid unterscheidet. So kann Tolbutamid kaum in die Zelle permeieren, während Glibenclamid konzentrationsabhängig aufgenommen wird (Hellman & al., 1973c). In Bezug auf Calciumfluxe weist Glibenclamid einige Besonderheiten auf. Messungen des Ca(2+)-Efflux in Abwesenheit von Ca(2+) und Glucose im Medium zeigten, daß Glibenclamid ähnlich wie Glucose eine spontane Effluxhemmung hervorruft (Maximum nach 6-8 Minuten), nach 15 Minuten dagegen der Efflux signifikant gesteigert wird (Malaisse, 1973b). Der Autor folgert daraus, daß der erste Effekt wie bei Glucose die Akkumulation des cytosolischen Calciums unterstützen soll, der zweite Effekt aber durch intrazelluläre Translokation des Calciums aus Organellen hervorgerufen wird. Andererseits erzielte Glibenclamid bei der Perfusion des Ratten-

pankreas im Gegensatz zu Glucose (16,7 mM) und Arginin (20 mM) auch noch bei 0,25 mM Ca(2+)-Ionen im Medium (2,56 mM Ca(2+) ist physiologisch) eine biphasische Insulinsekretion (Efendic & al., 1982), was vermuten läßt, daß es den Calciumeinstrom ionophoretisch erleichtert. Der Einfluß des Glibenclamids auf die Calciumfluxe ist also nicht völlig geklärt, dazu bedarf es weiterer vergleichender Untersuchungen. Auf die Unterschiede zwischen Tolbutamid und Glibenclamid bezüglich der Thiolabhängigkeit ihrer Insulinsekretionsstimulation wird im folgenden eingegangen. Es bleibt also weiterhin auch unklar, ob alle Sulfonylharnstoffe über einen einheitlichen Mechanismus wirken.

5.1.2.2. Thiolabhängigkeit der durch Sulfonylharnstoffe induzierten Insulinsekretion

Erste Hinweise auf die Thiolabhängigkeit der Tolbutamidwirkung auf die Insulinsekretion lieferten Befunde am perfundierten Pankreas, die zeigten, daß Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid den ersten Peak der Tolbutamid-stimulierten Insulinsekretion hemmen (Ammon & al., 1979a), GSH und L-Cystein diesen dagegen steigern (Ammon & Abdel Hamid, 1981). Exogenes Insulin vermindert den GSH-Gehalt von Langerhansschen Inseln und vermindert auch die Insulinsekretion nach Tolbutamidstimulation (Ammon & al., 1980). Auch bei isolierten Inseln kann die insulinsekretorische Wirkung von Tolbutamid mit GSH gesteigert, mit Diamid gehemmt werden (Abdel Hamid, 1983). Da die Stimulation der Insulinsekretion mit dem Ca-Ionophor A 23187 vom Thiolstatus unabhängig zu sein scheint, die Stimulation mit Glucose aber durch exogenes GSH gesteigert wird (Ammon & al., 1984a; Abb.4.1, Tab.4.1), könnte daraus gefolgert werden, daß der Wirkungsmechanismus des Tolbutamids dahingehend dem der Glucose gleicht, daß der Calciumeinstrom über den voltab-

hängigen Calciumkanal verläuft.

Auch bezüglich der Thiolabhängigkeit der Insulinsekretion wurde ein Unterschied zwischen Glibenclamid und Tolbutamid gefunden. Diamid vermag die durch Glibenclamid induzierte Insulinsekretion nicht zu hemmen, 0,1 mM GSH bewirkt keine Steigerung (Abb.4.1, Tab.4.1). Im ganzen Konzentrationsbereich von 0,05 - 2 mM beeinflußt GSH die durch Glibenclamid plus Glucose stimulierte Insulinsekretion nicht (Abb.4.2, Tab.4.2).

Diese Befunde unterstützen indirekt die Theorie, daß Glibenclamid ionophoretische Eigenschaften besitzt. Sie fördern aber auch den Zweifel daran, daß Tolbutamid und Glibenclamid über den gleichen Mechanismus zur Stimulation der Insulinsekretion führen.

5.1.3. Glucagon, Dibutyryl-cAMP, Isoprenalin

Auf die Bedeutung des cAMP beim Mechanismus der Insulinsekretion wurde man durch Befunde aufmerksam, die eine Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch Glucagon (Samols & al., 1965) und Methylxanthine (Malaisse & al., 1967a) zeigen. Vergleichende Studien des cAMP-Anstieges in der B-Zelle in Korrelation zur Insulinsekretion ergaben, daß generell sowohl Stoffe, welche die Adenylcyclase aktivieren, d.h. Glucagon, Isoprenalin, ACTH, TSH (Malaisse & al., 1967a) als auch solche, welche durch Hemmung der Phosphodiesterase wirken wie Theophyllin, Coffein (Malaisse & al., 1967a) Isobutylmethylxanthin (Montague & Cook, 1971), insulinotrope Wirkung in Gegenwart von Glucose haben. Von Charles wurde 1973 berichtet, daß Glucose bei perifundierten Inseln zur Zunahme des cAMP-Gehalts führt. Da sich aber cAMP-Anstieg und Insulinsekretion im Vergleich zu Theophyllin quantitativ

invers verhielten, wurde vermutet, daß cAMP bezüglich der Insulinsekretion die Funktion eines Modulators einnimmt. Von Ashcroft wurde 1976 der Stand der Kenntnisse dahingehend zusammengefaßt, daß der cAMP-Anstieg eine notwendige aber nicht hinreichende Bedingung der Insulinsekretion ist.

Ursache für den durch Glucose bewirkten cAMP-Anstieg ist wahrscheinlich, wie heute angenommen wird, die Aktivierung der Adenylcyclase durch Ca(2+) und Calmodulin (Valverde & al., 1979, Sharp & al., 1980). Hinweise für einen möglichen Wirkungsmechanismus der Modulatorwirkung des cAMP wurden durch Brisson & al. (1972) gegeben, die fanden, daß Theophyllin in Abwesenheit von Glucose einen starken Ca(2+)-Efflux hervorruft, als dessen Ursache sie eine glucoseunabhängige Translokation von Calcium aus organellgebundenen Speichern ins Cytoplasma vermuteten. Dies wird dadurch unterstützt, daß Stoffe, welche den insulinären cAMP-Spiegel erhöhen, die bei extrazellulärem Calciumentzug gehemmte glucosestimulierte Insulinsekretion wieder normalisieren (Brisson & Malaisse, 1973; Charles & al., 1975; Henquin, 1978b). Es sprechen einige Befunde dafür, daß die Umverteilung von organellgebundenem Calcium ins Cytosol in Folge des cAMP-Anstieges durch eine Hemmung der Aufnahme des Ions in Organellen zustande kommt (Howell & al., 1975; Sehlin, 1976; Sugden & Ashcroft, 1978).

Neben der Wirkung des cAMP auf die zelluläre Calcium-Umverteilung sei erwähnt, daß cAMP-erhöhende Substanzen wie Glucagon, Theophyllin, Coffein, IBMX, Glibenclamid und Tolbutamid die Proteinkinaseaktivität in Inseln erhöhen, cAMP-senkende Stoffe wie Adrenalin, Diazoxid und Imidazol die Aktivität des Enzyms hemmen (Montague & Howell, 1973).

a) Glucagon

Der Nachweis, daß Glucagon zur Akkumulation von cAMP in Langerhansschen Inseln führt, wurde von Turtle & Kipnis (1967) erbracht, nachdem Samols & al. (1965) einen Anstieg der Insulinsekretion durch Glucagon gemessen hatten.

Über die Bedeutung von Thiolgruppen zur Regulation der Adenylcyclaseaktivität in Rattenleber wurde von Mukherjee & Lynn (1979) berichtet. Nach Stimulation des Enzyms mit Glucagon wurde dessen Aktivität durch H_2O_2 oder pCMB konzentrationsabhängig gehemmt. Die Hemmwirkung dieser SH-Agentien konnte durch Mercaptoethanol und Dithiothreitol aufgehoben werden. Storm & Dolginow (1973) fanden, daß die Inaktivierung der Adenylcyclase in Rattenleber durch Jodoacetamid rascher verläuft, wenn zuvor mit Glucagon stimuliert worden war, woraus gefolgert wurde, daß die Einwirkung von Glucagon auf das Enzym die Freisetzung von SH-Gruppen bewirkt.

An Langerhansschen Inseln der Ratte wurde untersucht, ob der durch Glucagon stimulierte cAMP-Anstieg durch Methylenblau (Oxidationsmittel für NADPH) und t-BHP (Substrat der Glutathionperoxidase) beeinflußbar ist. Bei 5,6 mM Glucose konnte der cAMP-Anstieg mit t-BHP, nicht aber mit Methylenblau gehemmt werden, bei 16,7 mM Glucose verminderten beide Stoffe die cAMP-Zunahme. Die durch Glucagon induzierte Bildung von cAMP ist durch Oxidation von intrazellulärem NADPH und GSH gehemmt (Heinzl, 1979).

Ob andrerseits die Zufuhr von Thiolen zu einer Erhöhung des Glucagon-stimulierten cAMP-Anstiegs führt, wie dies bei Glucose (27,7 mM) durch GSH (0,4 mM) gefunden wurde (Ammon & al., 1982), ist noch nicht untersucht worden.

Von Abdel Hamid (1983) konnte weder durch GSH (0,1 mM) noch durch Diamid (0,1 mM) die durch Glucagon induzierte Insulinsekretion beeinflußt werden. Wie Abb.4.3 und Tab.4.2 zeigen, konnte in der vorliegenden Arbeit mit 1 mM GSH eine signifikante Erhöhung der Insulinsekretion gemessen werden. Allerdings wird dieser Befund dadurch relativiert, daß im Gegensatz zu Abdel Hamid und Sodoyez & al. (1969) durch Glucagon lediglich eine geringfügige, nicht signifikante Steigerung der Basalsekretion bei 5,6 mM Glucose gefunden wurde. Möglicherweise ist dieses Phänomen, wie von Norfleet & al. (1975) bereits vermutet, darauf zurückzuführen, daß ein Teil der Membranrezeptoren durch die Collagenaseverdauung zerstört wurde. Von Malaisse & al. (1967a) wurde ebenfalls berichtet, daß eine Stimulation der Insulinsekretion durch Glucagon nur durch Zusatz eines Kallikreininhibitors und ab einer Glucoseschwellenkonzentration > 5,6 mM zu erreichen war. Da die durch 1 mM GSH + Glucagon erzielte IRI-Menge quantitativ im Bereich der von Abdel Hamid gemessenen glucagonstimulierten Insulinmenge liegt, erhebt sich die Frage, ob GSH die gestörte Funktion der Rezeptoren wiederherstellt oder tatsächlich wie bei Glucosestimulation in einen thiolabhängigen Wirkungsmechanismus eingreift. Die bei anderen cAMP-Stimulatoren erzielten Ergebnisse lassen eine Thiolabhängigkeit der Glucagonwirkung stark bezweifeln.

b) Dibutyryl-cAMP

Dibutyryl-cAMP steigert die Insulinsekretion in Gegenwart von Glucosekonzentrationen > 5,6 mM (Sodoyez & al., 1969; Malaisse & al., 1970; Ammon & al., 1975). db-cAMP ist durch seine höhere Lipophilie besser membrangängig als cAMP, wird von der Phosphodiesterase weniger schnell abgebaut und dient daher als stärker wirksames Derivat der genuinen

Substanz (Cehovic & al., 1972). db-cAMP beeinflußt weder Glucosemetabolismus noch die glucosestimulierte Ca(2+)-Aufnahme. Es ermöglicht trotz Ca(2+)-Entzug im Medium zusammen mit Glucose eine Sekretion des Insulins (Brisson & al., 1972).

Bezüglich der Thiolabhängigkeit der durch db-cAMP ausgelösten Sekretionsantwort konnte Abdel Hamid weder durch Diamid- noch GSH-Zusatz (0,1 mM) eine Veränderung der Sekretionsleistung finden. Abb.4.4 und Tab.4.2 zeigen, daß zwischen GSH und db-cAMP keine Dosiswirkungsbeziehung besteht, obgleich db-cAMP eine kräftige Stimulation der Insulinsekretion bewirkt.

c) Isoprenalin

In Untersuchungen zur Beeinflussung der Insulinsekretion durch das autonome Nervensystem konnte Malaisse (1967b) an isolierten Langerhansschen Inseln zeigen, daß Cholinergika die Sekretion des Hormons steigern (hemmbar durch Atropin), adrenerge Substanzen diese dagegen hemmen. Wurden alpha-adrenerge Rezeptoren mit Phenoxybenzamin blockiert, konnte Isoprenalin, welches vorwiegend über ß-Rezeptoren wirkt, eine Steigerung der Insulinsekretion bewirken. Die Hemmwirkung von alpha-Adrenergika wurde von zahlreichen Autoren bestätigt und von Yamazaki & al. (1982) dahingehend differenziert, daß über alpha2-Rezeptoren der cAMP-Gehalt und dazu korrelierend die Insulinsekretion vermindert wird. Zwar konnte der insulinotrope Effekt einer ß-Rezeptorenstimulation unter verschiedensten Versuchsbedingungen nachgewiesen werden, doch existieren auch negative Befunde.

Porte berichtete 1967, daß durch Infusion von Isoprenalin in Humanstudien der Plasmainsulinspiegel ohne Beeinflussung des Plasmaglucosespiegels signifikant anstieg. Dieser Effekt war im Gegensatz zu einer

durch Glucagoninfusion induzierten Erhöhung des Plasmainsulinspiegels durch Propranolol hemmbar und wurde als direkte ß-Rezeptorenstimulation diskutiert.

Beim perfundierten Pankreas stimulierte Isoprenalin (0,05 mM) in einer Untersuchung von Loubatieres & al. (1970) zunächst die Insulinsekretion, bewirkte aber später eine fortschreitende Verringerung. Ein ß-Rezeptorenblocker (Propranolol) hemmte die Sekretionssteigerung, ein alpha-Rezeptorenblocker (Phenoxybenzamin) wirkte der zweiten Hemmphase entgegen, wodurch der unterschiedlichen Beeinflussung der Rezeptoren der erzielte duale Effekt zugeschrieben wurde. Die Autoren konnten weiterhin durch Verwendung selektiver ß-Rezeptorenblocker und -agonisten (Practolol, Salbutamol) in vivo am anaesthesierten Hund zeigen (1971), daß die Isoprenalin-induzierte Insulinsekretion von der Stimulation von ß2-Rezeptoren abhängt, eine Aktivierung von ß1-Rezeptoren dagegen nicht erforderlich ist. Ebenfalls am perfundierten Pankreas finden Burr & al. (1971) bei niedriger Isoprenalinkonzentration eine Steigerung, mit hohen Isoprenalinkonzentrationen eine Hemmung beider Sekretionsphasen. Eine solche Unterscheidung hoher und niedriger Konzentrationen steht in Einklang mit Befunden von Kuo & al. (1974), wonach 5 µM Isoprenalin, von ß-Rezeptorenblockern antagonisiert, den cAMP-Spiegel in isolierten Langerhansschen Inseln erhöhen, während 100 µM der Substanz die Adenylcyclase hemmen (Howell & Montague, 1973).

In einer Studie von Feldman & al. (1971) an isolierten Pankreasstücken beim Goldhamster erzielte Isoprenalin (100 µM) eine Hemmung der Insulinsekretion in Gegenwart hoher Glucose, keinen Effekt im Konzentrationsbereich von 0,1 µM - 1 mM bei substimulatorischer Glucosekonzentration (3 mM), in Gegenwart von 16,7 mM Glucose und Phenoxybenzamin

allerdings eine Erhöhung der Sekretionsantwort.

Keine Beeinflussung der Insulinsekretion sahen Gerich & al. (1975) bei der Perfusion des Rattenpankreas bei substimulatorischer Glucose- und niedriger Isoprenalinkonzentration und Vance & al. (1971) bei der Inkubation isolierter Inseln im Bereich von 1 - 10 µM Isoprenalin und 8,3 mM Glucose. Auch von Zielmann & Panten (1983) wurde berichtet, daß bei perfundierten Mäuseinseln hohe Isoprenalinkonzentrationen die Insulinsekretion hemmen, niedrige Konzentrationen auch in Gegenwart eines alpha-Rezeptorenblockers (Rauwolscin) keine Wirkung zeigen.

Von Smith & Porte (1976) wurden unterschiedliche Befunde bezüglich ß-adrenerger Insulinsekretionsstimulation dahingehend diskutiert, daß diese einmal auf unterschiedliche Isoprenalinkonzentrationen und damit quantitativ verschiedene Beeinflussung von alpha- und ß-adrenergen Rezeptoren zurückzuführen sind, andrerseits aber auch die Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche nicht konstant ist, sondern vielmehr abhängig von der Konzentration des Agonisten oder dem metabolischen Zustand der B-Zelle variiert. So wiesen auch Befunde von Wollheim & Sharp (1978) darauf hin, daß die Glucosekonzentration entscheidend ist für das Ausmaß von alpha- und ß-adrenerger Rezeptorenstimulation.

Über die Abhängigkeit der Adenylcyclaseaktivität vom intrazellulären GSH-Gehalt in Adipozyten ist bereits berichtet worden, wobei nochmals speziell die Hemmung der Isoprenalin-induzierten Adenylcyclaseaktivität durch Erniedrigung des Redoxquotienten betont werden soll (Mukherjee & Lynn, 1979). Dabei unterschieden die Autoren in einer späteren Untersuchung zwischen intrazellulären und extrazellulären SH-Gruppen dahingehend, daß intrazelluläre SH-Gruppen am katalytischen Teil im

reduzierten Zustand die Aktivität des Enzyms fördern, im Falle einer Oxidation hemmen, während eine weitere Reduktion von Thiolgruppen auf der Membranaußenseite mit Dithiothreitol speziell die hormonstimulierte (Glucagon, Isoprenalin) Adenylcyclaseaktivität durch Angriff am praekatalytischen Teil hemmt (Mukherjee & Mukherjee, 1981).

Wie bei der Stimulation der Insulinsekretion mit Glucagon und db-cAMP konnte in unserem Labor auch bei Isoprenalin mit 0,1 mM GSH bzw. 0,1 mM Diamid keine Beeinflussung der Sekretionsantwort beobachtet werden (Abdel Hamid, 1983). Auch mit niedrigeren und höheren GSH-Konzentrationen (0,05-2 mM) ist kein Effekt des Thiols auf die Wirkung des Stimulators erkennbar (Abb.4.4, Tab.4.2).
Somit stimmen die mit db-cAMP und Isoprenalin erzielten Befunde überein und bestätigen, daß Stimulatoren, welche über eine Aktivierung des cAMP-Systems wirken, thiolunabhängig sind.

5.1.4. Folgerungen

Faßt man diese Ergebnisse im Hinblick auf frühere Befunde in unserem Labor zusammen, so bestätigt sich, daß bei den Stimulatoren der Insulinsekretion zwischen thiolabhängigen und nicht thiolabhängigen unterschieden werden kann.
Unter Berücksichtigung der verschiedenen Mechanismen, über welche die verwendeten Stoffe zur Stimulation der Insulinsekretion führen, kann man Rückschlüsse auf die Lokalisation der Thiolwirkung ziehen. Da Ca-Ionophor A 23187 sowohl bezüglich Calciumaufnahme wie Insulinsekretion thiolunabhängig ist, scheinen die Reaktionsschritte, welche der Ca-Aufnahme folgen, vom Redoxzustand der Zelle unbeeinflußt zu sein.

Ein entscheidender Unterschied zwischen den Substanzen, deren Sekretionsantwort durch GSH gesteigert wird (Glucose, Glyceraldehyd, Leucin, Tolbutamid) und den nicht thiolabhängigen Stimulatoren (Ca-Ionophor A 23187, Isoprenalin, db-cAMP) ist darin zu sehen, auf welche Weise sie zum Anstieg des cytosolischen Calciums führen. Es scheint, daß sowohl ionophoretischer Ca(2+)-Einstrom wie auch intrazelluläre Calciumtranslokation durch exogen zugeführte Thiole unbeeinflußt bleiben. Die Thiolabhängigkeit obengenannter Stimulatoren liefert einen weiteren indirekten Hinweis darauf, daß die Calciumaufnahme über den voltabhängigen Calciumkanal Angriffspunkt der Thiolwirkung sein könnte.

5.2. Einfluß von Cystein und Cysteinderivaten auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion

Bei der Inkubation von isolierten Langerhansschen Inseln mit den niedermolekularen Thiolen Cystein, Cysteamin, D-Penicillamin, N-Acetyl-D-Penicillamin muß neben einer möglichen Wechselwirkung mit der äußeren Zellmembran auch mit intrazellulären Effekten gerechnet werden. Im Hinblick auf die Bedeutung der Thiole beim Insulinsekretionsmechanismus soll zunächst über den Einfluß der Substanzen auf den intrazellulären Thiol- bzw. GSH-Gehalt an anderen Geweben berichtet werden.

5.2.1. Erhöhung des intrazellulären Thiolgehaltes

5.2.1.1. Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes

Über die Schutzfunktion des GSH in der Zelle gegen verschiedenste

zellschädigende Noxen wurde bereits unter 1.1.3. berichtet. Tatsächlich konnte bei der Untersuchung der Mechanismen solcher Schädigungen der GSH-Verlust der Zelle als eine bedeutende Voraussetzung für die Zellfunktionsstörung erkannt werden. Dieser Zusammenhang scheint besonders bei der Hepatotoxizität einiger Stoffe, z.B. Paracetamol (Acetaminophen) und der Strahlentoxizität erwiesen.

Wichtige Schritte im Metabolismus des Paracetamols sind die Konjugation eines Metaboliten mit GSH und dessen Umwandlung zu einem Mercaptursäurederivat, welches ausgeschieden werden kann. Ist bei einer Paracetamolüberdosierung 70 % des GSH der Leberzelle durch diese Reaktion verbraucht, so geht der Metabolit eine Bindung mit Leberzellproteinen ein. Jollow & al. (1973) zeigten, daß eine direkte Korrelation zwischen der kovalenten Proteinbindung des Paracetamolmetaboliten und dem Ausmaß der Hepatotoxozität besteht. Diäthylmaleat, welches ebenfalls zu GSH-Verlust in Hepatozyten führt, selbst aber keine Leberzellschädigung auslöst, erhöht die Bindung des Paracetamolmetaboliten an Zellproteine und wirkt dadurch synergistisch mit Paracetamol (Mitchell & al., 1973). Wird einer mikrosomalen Membranpräparation in vitro außer Paracetamol GSH zugesetzt, wird die cytotoxische Proteinbindung des Metaboliten verhindert (Potter & al., 1973). Andere Autoren vermuten, daß die Lipidperoxidation, welche sie bei Paracetamol-induzierten Lebernekrosen beobachten konnten, ebenso eine Ursache der Zellschädigung sein könnte (Wendel & Feuerstein, 1981).

Auch der durch Bromobenzene verursachten Cytotoxizität in Hepatozyten geht ein Abfall des zellulären GSH-Gehaltes voraus. Cystein und Me-

thionin verhindern den Zelltod bei Hepatozyten nach Bromobenzene-Exposition (Orrenius & Jones, 1978).

Als weiteres Beispiel dafür, daß cytotoxische Prozesse in der Leber mit dramatischem GSH-Verlust einhergehen, ist die Verminderung des GSH-Gehaltes im Leberhomogenat (nach 2 Stunden um 22 %) nach Gabe einer akut toxischen Alkoholdosis bei Mäusen (Estler & Ammon, 1966). Auch eine Verminderung des Blut-GSH-Spiegels um 10 % konnte gezeigt werden. In einer Untersuchung von MacDonald & al. (1977) war der minimale GSH-Gehalt (45 %) nach 8 Stunden erreicht; die Abnahme war außerdem linear abhängig von der applizierten Alkoholdosis. Cysteamin, Cystein und Methionin erhöhten signifikant die Überlebensrate der Tiere nach Gabe einer letalen Alkoholdosis. Nach Studien von Viña & al. (1980) konnte die GSH-verbrauchende Wirkung einer akut toxischen Alkoholzufuhr auf die Bildung des Acetaldehyd zurückgeführt werden. Szabo & al. (1981) berichteten, daß die durch Ethanol verursachte Magenschleimhautschädigung bei Ratten mit einer dosisabhängigen Verminderung des Nichtprotein-Thiolanteils einhergeht. SH-haltige Substanzen schützen vor diesen Schleimhautläsionen.

Ionisierende Strahlung produziert in Materie reaktive Ionen und Radikale mit äußerst kurzer Lebensdauer. Die Bildung von Schwefelradikalen wirkt der raschen Kettenreaktion entgegen, da diese wenig reaktiv und ziemlich stabil sind und außerdem durch Zusammenschluß zu Disulfiden die weitere Reaktionsfolge stoppen. Entstandene Disulfide werden durch das physiologische Thiolredoxsystem der Zelle zu den ursprünglichen Thiolen umgewandelt. Strahlenschäden können daher auch als eine Verschiebung des Redoxsystems der Zelle angesehen werden, als dessen Fol-

ge die Anzahl der Membranthiolgruppen abnimmt und dadurch die Zellfunktion gestört wird (Rink, 1974). Es wird daher allgemein angenommen, daß die Radioresistenz der Zelle proportional zum intrazellulären Thiolgehalt zunimmt. Chemische Radioprotektion beruht also darauf, daß zugeführte Thiole als Radikalfänger fungieren und der Verschiebung des Redoxpotentials entgegenwirken. Interessant in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Mustea & Uray (1971), wonach eine Zufuhr von Cystein und Cysteamin, nicht aber von GSH, das Redoxpotential in der Zelle ins Negative verschieben.

Eine Beeinflussung des intrazellulären GSH-Gehaltes durch Zufuhr von Thiolen ist demnach vor allem von toxikologischer Bedeutung. Zu diesem Zweck sind verschiedene Angriffspunkte möglich:

1) Direkte Zufuhr von GSH

2) Beeinflussung der GSH-Biosynthese durch Zufuhr von Biosynthesepräcursoren

3) Freisetzung von GSH aus proteingebundenen Speichern.

5.2.1.1.1. Direkte Zufuhr von GSH

Über die Wirksamkeit von exogen zugeführtem GSH zur Erhöhung der intrazellulären GSH-Konzentration liegen je nach Organ und auch Untersuchungsmodell unterschiedliche Befunde vor. Viele Versuche, toxische Reaktionen von Schadstoffen durch Zufuhr von GSH zu verbessern, haben wohl positive Ergebnisse in vitro, nicht aber in vivo ergeben. Auch die insulinotrope Wirkung der Substanz bei der Inkubation isolierter Inseln (Hellman & al., 1975a; Ammon & al., 1984a) konnte in vivo nicht reproduziert werden (Melien, 1984). Dieser Befund könnte darauf zurückgeführt werden, daß bei den verwendeten gefasteten Tieren die An-

sprechbarkeit auf GSH vermindert war.

Gazzard & al. (1974) berichteten, daß eine GSH-Behandlung bei Paracetamolvergiftung unbefriedigend war und vermuteten, daß die Ursache dafür in dessen ungenügender Membrangängigkeit zu suchen sei. Tatsächlich wurde bei der Perfusion von Rattenleber keine Aufnahme von GSH beobachtet (Hahn & Oberrauch, 1978). Bei durch 24 stündiges Fasten erniedrigter GSH-Gewebekonzentration konnte durch i.p.-Injektion einer GSH-Lösung bei Mäusen in der Leber kein Anstieg des Glutathiongehaltes, in der Niere nur ein geringer Effekt gezeigt werden. GSH verminderte in diesem Tiermodell den durch Paracetamol provozierten Glutathionverlust der Leber nur schwach (Puri & Meister, 1983).

Daß die Membrangängigkeit des GSH den limitierenden Faktor seiner Wirksamkeit darstellt, ist aus Befunden von Wendel & Jaeschke (1982) zu ersehen, wonach die i.v.-Applikation einer GSH-Lösung nur beschränkten Effekt auf die durch Paracetamol induzierte Lipidperoxidation und Lebernekrose hat, während in Liposomen verkapseltes GSH dosisabhängig optimalen Schutz vor der Schädigung gab.

Wendet man die Tatsache, daß Ester im allgemeinen besser membrangängig sind als die entsprechende Säure, auf Glutathion an (Monomethyl- und Monoäthylester), so wird im obengenannten Tiermodell nach i.p.-Gabe des GSH-Esters in Leber und Niere eine Verdoppelung des Zellglutathions gemessen. Nach Verminderung der zellulären GSH-Konzentration mit Buthioninsulfoximin vervierfacht sich der GSH-Spiegel in Leber und Niere durch Gabe des Glutathionesters. Die Substanz verhindert weiterhin nicht nur den GSH-Verlust nach Paracetamolexposition sondern verursacht zusätzlichen GSH-Anstieg. Die Versuchstiere überleben eine letale Paracetamoldosis, wenn sie zuvor mit dem Glutathionester behandelt wurden (Puri & Meister, 1983).

Eine erfolgreiche Anwendung von Glutathion zum Zwecke intrazellulärer Beeinflussung seiner Funktionen setzt Manipulationen zur Erhöhung seiner Membrangängigkeit (Verkapselung in Liposomen, Veresterung) voraus.

5.2.1.1.2. Beeinflussung der GSH-Biosynthese durch Zufuhr von Biosynthesepräcursoren

Da Cystein wegen seiner geringen zellulären Konzentration als limitierender Faktor der GSH-Biosynthese betrachtet werden kann (Tateishi & al., 1977), erscheint es sinnvoll, die Syntheserate des GSH über eine Erhöhung des intrazellulären Cysteins zu erreichen.

a) Einfluß von diätetischen Maßnahmen

Nach 48 stündigem Fasten wurden Ratten mit einer Diät, welche radioaktiv markiertes L-Cystein oder Methionin enthielt, gefüttert. Es wurde untersucht, ob diese Aminosäuren eher in Proteine oder GSH der Leber eingebaut, wird. In Abwesenheit von Tryptophan wird Cystein bevorzugt zur GSH-Biosynthese, Methionin dagegen größtenteils zur Proteinsynthese verwendet. Allerdings erfährt Methionin nach zusätzlich erhöhter Zufuhr eine Umwandlung in Cystein über den Cystathioninweg (s. 1.1.4.), dessen Einbau in GSH den GSH-Gehalt 8 -fach erhöht (Tateishi & al., 1981). Damit könnte intrazelluläres GSH als Speicher für zugeführtes Cystein betrachtet werden. Diese Erklärung wird durch frühere Befunde dieser Arbeitsgruppe unterstützt, wonach beim Abbau von 35S-markiertem GSH zwei verschiedene Halbwertszeiten gefunden wurden, die auf zwei getrennte GSH-Pools zurückzuführen sind: 1) ein labiler GSH-Pool (ca. 4-5 µmol/g; t1/2=1,7 h) fungiert als Reservoir für Cystein und kann die Aminosäure bei Bedarf mobilisieren, in ihm wird überschüssiges Cystein aufgenommen. 2) der stabile Pool (ca. 3 µmol/g; t1/2=28 h) unterliegt der langfristigen Regulation (Tateishi & Higa-

shi, 1978).

Die Möglichkeit, den GSH-Gehalt von Zellen durch bilanzierte Aminosäurendiäten zu beeinflussen, wird allerdings dadurch relativiert, daß offensichtlich andere applizierte Aminosäuren (z.B. Tryptophan) das Schicksal des Cysteins bestimmen, zum anderen scheint die Zufuhr von Cystein durch seine, vermutlich auf extrazellulären Reaktionen begründete, Toxizität begrenzt. Von Birnbaum & al. (1957) liegen Untersuchungen vor, daß die Gabe von 15,7 g N/kg L-Cystein für Ratten letal ist. Mehrfach wurde auch eine schädigende Wirkung der Aminosäure in höherer Konzentration auf das zentrale Nervensystem berichtet. In Versuchen von Olney & al. (1971) verursachte L-Cystein bei einer Dosis von 12 mMol/kg neurotoxische Schäden bei 10 Tage alten Mäusen.

Auch vom Cysteinderivat D-Penicillamin konnte durch 14 tägige Fütterung an Ratten eine Erhöhung des GSH-Gehaltes der Leber ohne Beeinflussung der GSSG-Konzentration sowohl bei chronisch alkoholbehandelten wie bei unbehandelten Tieren beobachtet werden (Hassing & al., 1979). Allerdings bleibt unsicher, ob diese Wirkung ebenfalls durch Steigerung der GSH-Biosynthese erzielt wird.

b) Einfluß von Cystein-freisetzenden Systemen

Mehrere Versuche, durch i.p.-Applikation von Cystein die GSH-Verfügbarkeit zu verändern, haben gezeigt, daß zwar offensichtlich ein Einbau in GSH erfolgt, allerdings nur eine beschränkte Steigerung der zellulären GSH-Konzentration erzielt wird. Ball (1966) fand in mehreren Geweben eine Erhöhung des Nichtprotein-Thiolanteils, welchen er fast vollständig als Cystein identifizierte, deren Maximum nach 30 Minuten erreicht war und nach 2,5 Stunden zum Normalniveau absank. Der resultierende GSH-Anstieg war nur gering. i.p.-Cysteingabe bei Mäusen

verminderte die Bindung des Paracetamolmetaboliten an Leberproteine (Mitchell & al., 1973) und normalisierte den GSH-Gehalt der Leber nach Paracetamolapplikation (Puri & Meister, 1983). In vitro war schon eine Erhöhung der GSH-Konjugatbildung mit Paracetamolmetaboliten bei Rattenhepatozyten beobachtet worden (Thor & al., 1979).

Die Ursache dafür, daß eine erhöhte Gabe von Cystein nur mit beschränktem Erfolg zur Steigerung der GSH-Biosynthese angewandt werden kann, könnte in dem dadurch gesteigerten Abbau der Aminosäure durch die Dioxygenase zu suchen sein (Kohashi & al., 1978, s. 1.1.4.).

Eine solche Steigerung der Enzymaktivität könnte dadurch vermieden werden, daß Cystein erst in der Zelle allmählich freigesetzt wird und in kleinsten Raten zur GSH-Biosynthese verfügbar ist. Ist der Cystathioninweg im entsprechenden Gewebe aktiv, kann durch Gabe von Methionin eine solche Freisetzung erfolgen. Dieser Stoffwechselweg scheint aber z.B. in Nierenzellen nicht in dem Maße wie in Leberzellen zu funktionieren (Moldeus & al., 1981).

Eine interessante Möglichkeit eines Cystein-liefernden Systems zeigten Untersuchungen von Williams & Meister (1982) auf. 5-Oxo-L-prolinase, ein Enzym des gamma-Glutamylcycles, katalysiert die Bildung von Glutamat aus 5-Oxoproline. Bei der Untersuchung von 5-Oxoprolin-Analogen bezüglich ihrer Reaktion mit dem Enzym wurde gefunden, daß L-2-Oxothiazolidin-4-carboxylat eine hohe Affinität zum Enzym hat, die normale Reaktion mit 5-Oxoprolin hemmt und selbst in Cystein umgewandelt wird. Wurde diese Substanz i.p. an über Nacht gefastete Mäuse verabreicht, konnte sukzessiv ein Anstieg des Leberglutathiongehaltes gemessen werden mit Maximum nach 4 Stunden und Abfall zum Normalniveau nach 7 Stunden. Offensichtlich wurde entstandenes Cystein sofort zur GSH-Biosynthese verbraucht, da keine Zunahme des Cysteingehaltes ge-

funden wurde (Williams & Meister, 1981). Von den Autoren wurde weiterhin gezeigt, daß das Thiazolidinderivat den GSH-Gehalt der Leber je nach Zeitpunkt der Applikation um 30-110 % des Kontrollwertes steigert, wenn dieser zuvor durch Paracetamolgabe auf 18 % des Kontrollwertes gesenkt wurde. Damit war die Wirksamkeit der Substanz doppelt so groß wie bei N-Acetyl-Cystein (Williamson & al., 1982).

Es sollte in diesem Zusammenhang vermerkt werden, daß Untersuchungen zur Erhöhung des Glutathiongehaltes in Zellen meist an Geweben durchgeführt wurden, deren GSH-Gehalt durch Verabreichung von GSH-Räubern wie Diäthylmaleat oder Paracetamol oder durch Fasten vermindert war. Nach Tateishi & Higasi (1978) nimmt die GSH-Konzentration durch 24 stündiges Fasten auf zwei Drittel bis die Hälfte der ursprünglichen Konzentration ab. Ob eine Steigerung der GSH-Biosynthese über den Normallevel hinaus möglich ist, bleibt im Hinblick auf die feed-back-Hemmung dieses Syntheseweges (Richman & Meister, 1975) umstritten. Eine Umgehung dieses feed-back-Mechanismus und daraus resultierende Erhöhung des GSH-Gehaltes in der Niere konnte mit gamma-Glutamylcystein gezeigt werden (Anderson & Meister, 1983).

5.2.1.1.3. Freisetzung von GSH aus proteingebundenen Speichern

In Linsengewebe (Harding, 1969) und Erythrozyten (Huisman & Dozy, 1962) konnten erstmals gemischte Disulfide zwischen Protein-SH-Gruppen und GSH gefunden werden. Harrap & al. (1973) vermuteten aufgrund ihrer Untersuchungen in verschiedenen Geweben, daß ein großer Teil des zellulären GSH in Form solcher Protein-GSH-Disulfide vorliegt. Revesz & Modig (1965) geben den proteingebundenen GSH-Anteil im Körper mit 30 %

des Gesamtglutathiongehaltes an. Als sogenannte "hidden pools", also Reservepools für GSH, aus denen reduziertes Glutathion durch Thioltransferasereaktionen freigesetzt werden kann, bezeichnen Kosower & Kosower (1976) solche gemischten Disulfide.

Eine interessante Arbeit über die Freisetzung von GSH aus proteingebundenen Speichern durch Thioltransferasereaktionen mit einem zugeführten Thiol liegt von Modig & al. (1972) an Ehrlich Aszites-Tumorzellen vor. Zunächst wurde gezeigt, daß nach Reduktion der Disulfidbrücken in Zellproteinen und anschließender Analyse durch Gelfiltration GSH das einzige niedermolekulare Thiol ist, welches proteingebunden vorliegt. Nach 10 minütiger Inkubation der Zellen mit 35S-markiertem Cysteamin waren 12 % des Thiols proteingebunden; die Bindung war 95 Minuten stabil. Der Nichtprotein-Thiolanteil der Zelle nahm während einer 30 minütigen Inkubation mit Cysteamin dosisabhängig zu und wurde größtenteils als GSH identifiziert. Auch bei der Inkubation von isolierten Zellproteinen mit Cysteamin und anschließender chromatographischer Analyse konnte eine Freisetzung von GSH gemessen werden. Es scheint dadurch also erwiesen, daß proteingebundenes GSH unter den vorliegenden Versuchsbedingungen gegen Cysteamin ausgetauscht wurde.

Ein derartiger Reaktionsmechanismus könnte daher als Erklärung für die Zunahme des GSH-Gehaltes durch zugeführte Thiole, speziell aber auch für die Strahlenschutzwirkung des Cysteamins gelten. Jellum & Skredes (1976) vermuten, daß dieser Reaktiontypus auch für D-Penicillamin zutrifft, da diese Substanz leicht gemischte Disulfide bildet. Bei D-Penicillamin-Behandlung rheumatischer Erkrankungen konnte über einen Zeitraum von 2-3 Monaten in Erythrozyten der Patienten ein allmählicher Anstieg des GSH-Spiegels festgestellt werden, welcher nach 2-8

wöchiger Therapie begann (Munthe & al., 1979).

5.2.1.2. Direkte Wirkung von Thiolen als SH-Spender

Es sollte nicht außer acht gelassen werden, daß zugeführte thiolhaltige Substanzen außer extrazellulärer Membranwirkung und intrazellulärer GSH-Freisetzung neben einer Vielzahl möglicher anderer Stoffwechselwirkungen auch direkt als Substrat in GSH-verbrauchende Reaktionen eingreifen könnten. So ist von der Glutathionperoxidase bekannt, daß sie auch in der Lage ist, Cystein oder Cysteamin für die Reaktion mit H_2O_2 zu benutzen. Diese Reaktion verläuft erwartungsgemäß langsamer als mit GSH (Little & O'Brien, 1968).

In Bezug auf die Bedeutung des GSH im Insulinsekretionsmechanismus könnten zugeführte Thiole, sofern sie in die B-Zelle gelangen, wie intrazelluläres GSH dessen spezifische Redoxreaktionen zur Erhaltung des reduzierten Zustandes von Membranthiolen ausführen, wenn auch in enzymkatalysierten Vorgängen wegen geringerer Spezifität mit kleinerer Reaktionsgeschwindigkeit. Treffen solche Vermutungen zu, so müßten solche Thiole, die strukturell dem GSH bzw. dessen SH-Komponente Cystein am nächsten verwandt sind, am wirksamsten die glucoseinduzierte Insulinsekretion steigern. Tatsächlich deuten Befunde in unserem Labor (unveröffentliche Daten) darauf hin, daß die Cysteinstruktur von entscheidender Bedeutung ist. Eine solche strukturelle Wirkkomponente unterstreicht die Annahme, daß spezifische GSH-abhängige Enzymreaktionen unterstützt werden könnten.

5.2.1.3. Folgerungen

Wie aus obengeschilderter Literatur hervorgeht, scheinen Cystein (Ball, 1966; MacDonald & al., 1977; Puri & Meister, 1983), Cysteamin

(Modig & al., 1972; MacDonald & al., 1977) und D-Penicillamin (Hassing & al., 1979; Munthe & al., 1979) die intrazelluläre GSH-Verfügbarkeit zu beeinflussen. Von N-Acetyl-D-Penicillamin liegen darüber keine Untersuchungen vor, es konnte lediglich eine Zunahme des Nicht-Proteinthiolgehalts in Erythrozyten nachgewiesen werden (Aaseth, 1976). Der Mechanismus solcher Wirkung ist allerdings nicht gesichert.

Eine Steigerung der GSH-Biosynthese durch Zufuhr von Präcursoren scheint sinnvoll und logisch, wenn der GSH-Gehalt zuvor vermindert wurde. Ist der normale GSH-Level erreicht, ist allerdings eine feedback-Hemmung zu erwarten (Richman & Meister, 1975). Eine weitere Erhöhung der GSH-Konzentration wäre durch Umgehung des feed-backs zu erreichen, wie dies von Anderson & Meister (1983) mit gamma-Glutamylcystein gezeigt wurde.

Die Fähigkeit von SH-Substanzen, GSH aus proteingebundenen Speichern freizusetzen, beruht auf ihrer Bereitschaft Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen einzugehen. Bei Proteinen als Reaktionspartner sind besonders niedermolekulare Verbindungen mit sterisch möglichst ungehinderter SH-Gruppe wie z.B. Cysteamin geeignet (Jocelyn, 1972). Aus den Befunden von Modig & al. (1972), Hassing & al. (1979) und Munthe & al. (1979) scheint dieser Mechanismus zumindest für Cysteamin und D-Penicillamin wahrscheinlich.

Inwieweit Cystein, Cysteamin, D-Penicillamin und N-Acetyl-D-Penicillamin in der Lage sind, selbst GSH-abhängige Enzymreaktionen einzugehen, ist ungewiß.

Die Möglichkeit, durch obengenannte Substanzen den intrazellulären GSH-Gehalt zu erhöhen, erscheint im Hinblick darauf interessant, daß bei alten Ratten im Gegensatz zu erwachsenen Tieren durch Glucose kein Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten erfolgte und gleichzeitig die Insulin-

sekretion vermindert war (Ammon & al., 1984b).

5.2.2. Einfluß der strukturellen Veränderungen auf die Stabilität und Reaktivität der verwendeten Thiole

Thiole unterliegen in wässriger Lösung einer mehr oder minder raschen Autoxidation, wobei Spuren von Schwermetallionen als Katalysator benötigt werden. Dabei ist die Oxidationsrate abhängig von Temperatur, pH, Art des Mediums, Art des Katalysators und dem Sauerstoffpartialdruck. Meist weisen Lösungen mit höheren Thiolkonzentrationen größere Stabilität auf. Unter milden Oxidationsbedingungen, wie sie während der angewandten Inkubation vorlagen, sind Disulfide das vorwiegende, wenn nicht einzige Oxidationsprodukt (Jocelyn, 1972).

Die Struktur der thiolhaltigen Substanz ist von Bedeutung für das Ausmaß der Autoxidation. Wie aus den unter 3.5. beschriebenen Versuchen zur Stabilitätsmessung der verwendeten Substanzen bei verschiedenen Konzentrationen unter Inkubationsbedingungen zu ersehen ist, nimmt die Stabilität der Thiole in der Reihenfolge Cysteamin < Cystein < D-Penicillamin < GSH < N-Acetyl-D-Penicillamin zu. Dies ist darauf zurückzuführen, daß jeder zusätzliche Substituent, sofern seine sterische Position zur SH-Gruppe es erlaubt, als Schutz der Thiolgruppe vor Autoxidation dienen kann. Bei D-Penicillamin bewirken die beiden Methylgruppen eine sterische Hinderung für die Thiolgruppe, sodaß die Autoxidation im Vergleich zu Cysteamin und Cystein langsamer verläuft, die Disulfidbildung also erschwert ist (Jellum & Skredes, 1976).

D-Penicillamin reagiert bevorzugt mit Disulfiden in Thiolaustauschreaktionen zur Bildung gemischter Disulfide. Dabei ist die Geschwindigkeit solcher Reaktionen mit der des Glutathions zu vergleichen

(Jellum & Skredes, 1976). Einen interessanten Vergleich der Reaktivität der Substanzen Cystein, Cysteamin, D-Penicillamin und GSH kann man aus der Messung der Zeit bis zur Gleichgewichtseinstellung bei einer Thiolaustauschreaktion mit Cystin erhalten: bei Cysteamin 1-2 Minuten, bei Cystein 2-3 Minuten, bei GSH 10-15 Minuten, bei D-Penicillamin 12-17 Minuten (Jellum & Skredes, 1976). Demnach nimmt die Reaktivität bei der Spaltung von Disulfidbindungen in der folgenden Reihenfolge: Cysteamin > Cystein > GSH > D-Penicillamin ab.
Eine Erhöhung der Stabilität geht also mit verminderter Reaktivität einher.

5.2.3. Pharmakologische Anwendung der untersuchten Thiole

a) Cystein

Cystein wird in der Ophthalmologie bei perforierter Cornea lokal angewandt. Als Aminosäure ist z.T. die Thiol- oder Disulfidform Bestandteil von Aminosäuremischungen, welche als Nahrungsersatz gegeben werden (Martindale, 1982).

b) Cysteamin

Cysteamin verhindert bei Applikation während der ersten 10 Stunden die durch Paracetamolüberdosierung ausgelöste Hepatotoxizität (Prescott & al., 1976). Wegen seiner Nebenwirkungen ist es allerdings inzwischen von gleichwirksamen, weniger toxischen Substanzen wie z.B. Methionin (Crome & al., 1976), N-Acetylcystein (Prescott & al., 1979) verdrängt und als Mittel zweiter Wahl zu betrachten.
Ebenso ist Cysteamin in der Strahlenschutztherapie durch wirksamere und besser verträgliche Stoffe wie z.B. Mercaptopropionylglycin (Nagata, 1981) ersetztbar.

In vereinzelten Fällen wurde Cysteamin erfolgreich gegen nephropathische Cystinosis angewandt (Martindale, 1982).

c) D-Penicillamin

Durch seine chelatbildenden Eigenschaften wird die Substanz bei Schwermetallionenvergiftungen (Blei, Kupfer, Zink, Quecksilber) wie auch bei Wilson'scher Erkrankung (Kupferspeichererkrankung) verabreicht.

Als Antirheumatikum zeigt D-Penicillamin gute Wirksamkeit bei schwerer rheumatischer Arthritis, vermutlich durch Eingriff in die Collagenbiosynthese (Hemmung der Quervernetzung).

Weiterhin kann die Substanz bei Cystinurie eingesetzt werden (Martindale, 1982).

Zur Behandlung der Paracetamolvergiftung kommt die Substanz nicht in Frage, da sie die Nephrotoxizität des Paracetamols potenziert (Prescott & al., 1976).

d) N-Acetyl-D-Penicillamin

N-Acetyl-D-Penicillamin hat wie D-Penicillamin chelatbildende Eigenschaften und wurde bei Quecksilbervergiftungen angewandt. Über seine Wirksamkeit im Vergleich zu D-Penicillamin liegen unterschiedliche Aussagen vor (Goodman & Gilman, 1980; Martindale, 1982).

5.2.4. Einfluß von Cystein, Cysteamin, D-Penicillamin und N-Acetyl-D-Penicillamin auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion

5.2.4.1. Cystein

Beim perfundierten Pankreas der Ratte beeinflußt L-Cystein (5 mM) die

Menge sezernierten Insulins bei substimulatorischer Glucosemenge nicht. In Anwesenheit von 11,1 mM Glucose wird der erste Peak durch die Aminosäure potenziert, die zweite Sekretionsphase dagegen gehemmt (Ammon & Abdel Hamid, 1981).

Bei der Inkubation isolierter Langerhansscher Inseln mit Cystein ist sowohl bei substimulatorischer Glucosemenge (bei 4 mM, 6 mM, 7 mM signifikant, bei 5 mM n.s.) als auch bei stimulatorischer Glucosemenge (bei 3 - 7 mM signifikant) eine dosisabhängige Steigerung der Sekretionsrate erkenntlich (Abb.4.5, Tab.4.3).

Bei kleineren Cysteinkonzentrationen war in Vorversuchen keine Beeinflussung der Insulinsekretion vorhanden. Von Hellman & al. (1975b) konnte mit dextrangebundenem Cystein bei isolierten Mäuseinseln in Gegenwart von 10 mM Glucose bei einer Konzentration entsprechend 0,1 mM Cystein eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion während einer 30 minütiger Inkubation gemessen werden. Da die Substanz wegen ihrer Molekülgröße nicht in die B-Zelle permeieren kann, wird der gemessene Effekt auf eine Wechselwirkung mit der B-Zellmembran zurückgeführt. Bei Verwendung der ungebundenen Aminosäure scheinen sich bei niedriger Konzentration extrazelluläre und intrazelluläre Einflüsse zu überlagern. Möglicherweise spielt in diesem Konzentrationsbereich der rasche Abbau der Aminosäure in der Zelle eine Rolle. Der von Hellman berichtete Befund ist für L-Cystein nicht reproduzierbar.

Zur Interpretation der vorliegenden Ergebnisse müssen zweierlei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1) L-Cystein fungiert in den untersuchten Konzentrationen als Stimulator der Insulinsekretion.

2) Der gemessene Effekt beruht auf unspezifischen toxischen Wirkungen

der Substanz auf die B-Zelle.

Messungen des Rubidium-Effluxes mit Cystein in unserem Labor (unveröffentlichte Befunde) scheinen die erste These zu belegen. Dabei wird in Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen zur Insulinsekretion der Rubidiumefflux in Anwesenheit von 2,8 mM Glucose durch Cystein (4 mM) signifikant gehemmt. Nach Umschalten des Perifusionssystems auf cysteinfreies Medium ist dieser Effekt allerdings nur mit Verzögerung reversibel. Diese Rubidium-Effluxhemmung unterstützt also die Vermutung, daß Cystein in der Konzentration von 4 mM an isolierten Inseln als Stimulator der Insulinsekretion wirkt. Weitere Untersuchungen zum Calciuminflux wären zum schlüssigen Beweis allerdings erforderlich.

Über die Ursache der Verzögerung der Reversibilität können derzeit nur Vermutungen angestellt werden. Möglicherweise unterscheidet sich die erzielte Effluxhemmung von der durch Glucose erzielten im Mechanismus der Auslösung und ist langsamer aufzuheben. Denkbar wäre auch, daß ein erhöhter intrazellulärer Cysteingehalt Ursache des Membraneffekts ist und nach Beendigung der Cysteinzufuhr die Wirkung erst mit dem Abbau des Cysteins in der Zelle vermindert wird.

Über die Aufnahme von Cystein in die Zelle liegen Befunde an isolierten Hepatozyten vor. Reed & Orrenius (1977) berichteten, daß nach 15 minütiger Inkubation mit 3 mM Cystein 14 nmol/l Million Zellen, mit 5 mM 21 nmol/l Million Zellen aufgenommen wurde. In Versuchen von Beatty & Reed (1981) wird der Cysteingehalt der Hepatozyten durch 20 minütige Inkubation mit 3 mM Cystein und 0,67 mM Methionin verdoppelt. Bei beiden Untersuchungen wird eine Beteiligung des zugeführten Cysteins an der GSH-Biosynthese gemessen. Zwar sind solche Befunde weder quantitativ noch qualitativ auf die vorliegenden Versuchsbedingun-

gen übertragbar, doch ließe sich daraus spekulieren, daß für die insulinfreisetzende Wirkung des Cysteins eine so hohe Konzentration (3-4 mM) erforderlich ist, weil die Aufnahme der Substanz in die Zelle dafür Voraussetzung ist und diese Aufnahme erst ab dieser Konzentration ausreichend für den folgenden Effekt ist.

Ob eine Beeinflussung des intrazellulären Glutathionsystems als Ursache der erzielten Stimulation der Insulinsekretion in Frage kommt, muß aufgrund der mit anderen Thiolen (Cysteamin und D-Penicillamin) gemessenen Wirkungen bezweifelt werden.

5.2.4.2. Cysteamin

Bei der Inkubation mit Cysteamin konnte im gesamten Konzentrationsbereich von 0,1 - 3 mM in Gegenwart substimulatorischer Glucosemenge (2,8 mM) keine Beeinflussung der Basalsekretion beobachtet werden. Die durch 11,1 mM Glucose stimulierte Insulinsekretion dagegen wurde durch 0,1 mM Cysteamin signifikant gesteigert. Höhere Cysteaminkonzentrationen (0,5 - 3 mM) konnten die Sekretionsrate nicht weiter erhöhen (Abb.4.6, Tab. 4.4). Der maximal potenzierende Effekt war bereits mit 0,1 mM Cysteamin erreicht.

Von der Substanz muß aufgrund ihrer Molekülgröße eine Permeation in die Zelle angenommen werden. Nach den Befunden von Modig & al. (1972) an Ehrlich Aszites-Tumorzellen zu schließen, könnte als Folge davon eine GSH-Freisetzung aus Zellproteinen den freien intrazellulären GSH-Gehalt erhöhen. Die beobachtete Steigerung der Insulinsekretion wäre dann mit der Erhöhung des Redoxzustandes ß-zellulärer Thiolgruppen zu erklären. Da Cysteamin intrazellulär wahrscheinlich nur unspezifisch und daher im Gegensatz zu Cystein langsam abgebaut wird, andrerseits aber über eine hohe Reaktivität verfügt, sind nur kleine Kon-

zentrationen zur Erzielung der beobachteten Wirkung ausreichend. Da keine dosisabhängige Steigerung erfolgt, ist entweder die Erhöhung der Sekretion bereits bei 0,1 mM Cysteamin maximal, oder durch einen unbekannten Mechanismus, beispielsweise die Aufnahme der Substanz in die Zelle, begrenzt. Denkbar wäre auch, daß bei 0,1 mM Cysteamin das optimale Redoxpotential der Substanz und damit maximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt.

Nachdem von Szabo & Reichlin (1981) durch perorale Gabe von Cysteamin an Ratten eine Erniedrigung des Somatostatingehaltes in verschiedenen Geweben gemessen wurde, deren Minimum beim Pankreas nach 7 Stunden erreicht war, ist ungewiß, inwieweit die beobachtete Wirkung auf die Insulinsekretion durch paracrine Wechselwirkungen zustande kommt.

Bei in-vivo-Untersuchungen an Ratten bewirkte eine subcutane Cysteamindosis von 300 mg/kg eine Senkung des Sauerstoffverbrauches und der Körpertemperatur, sowie eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Adrenalin, Glucose, Insulin und Glucagon. Bereits 10 Minuten nach Cysteamingabe waren die Plasmainsulin- und glucagonspiegel erhöht. Wurde gleichzeitig mit Cysteamin Somatostatin verabreicht, wurde die Steigerung der Hormonkonzentration im Plasma verhindert (Brown & al., 1983).

Sorenson & al. (1983) stellten fest, daß 24 Stunden nach Cysteamin-Applikation (300 mg/kg Cysteamin subcutan) der Somatostatingehalt des Pankreas signifikant erniedrigt war; Glucagon- und Insulingehalt blieben unverändert. Wurde das Pankreas eines so vorbehandelten Tieres mit Glucose (16,7 mM) perfundiert, konnte die Somatostatinsekretion nicht stimuliert werden, während die Insulin- und Glucagonfreisetzung gegenüber der Kontrolle unbeeinflußt war. Die Autoren schließen daraus, daß durch Cysteaminvorbehandlung D-Zellen nicht mehr auf Glucosestimula-

tion ansprechen, A- und B-Zellen aber ihre Funktion quantitativ beibehalten. Diese Beobachtung widerspricht den Befunden von Brown & al. insofern nicht, als in dessen Untersuchungen der erhöhte Plasmainsulinspiegel lediglich 1 Stunde lang erhöht war und dann abfiel. Die fehlende Hemmwirkung des Somatostatins auf die Insulinsekretion könnte nach 24 Stunden durch andere Mechanismen gegenreguliert worden sein.

Die obigen Untersuchungen lassen allerdings bezüglich der verwendeten Cysteaminkonzentration keinen direkten Vergleich mit den eigenen Ergebnissen zu. Patel & Pierzchala (1983) berichteten, daß nach 1 stündiger Inkubation von Monolayer-kultivierten neonatalen Inseln der Ratte 0,3 mM und 1 mM Cysteamin den Somatostatingehalt der Inseln signifikant erniedrigten ohne den Glucagon- und Insulingehalt zu beeinflussen. Eine Erhöhung der Insulin- und Glucagonsekretion konnte dagegen bei 1 stündiger Inkubation erst mit 1 mM Cysteamin gezeigt werden.

Cysteamin scheint allerdings noch weitere Sekretionsvorgänge von Hormonen zu beeinflussen. So konnten Millard & al. (1983a) eine Erniedrigung des TSH-Blutspiegels und eine Veränderung der GH-Sekretion (1983b) zeigen. An isolierten Sekretionsgranula des Hypophysenvorderlappens steigern Thiole (GSH, 5 mM; Cystein, 20 mM; Dithiothreitol, 0,1 mM; Mercaptoethanol, 1 mM) die Sekretion von Wachstumshormon und Prolactin mit Ausnahme von Cysteamin (5 mM), welches die Freisetzung der Hormone hemmt (Lorenson & Jacobs, 1982). Cysteamin erhöht bei Ratten außerdem die Konzentration von Gastrin im Serum sowohl nach Fasten wie nach Nahrungsaufnahme (Lichtenberger & al., 1977).
Inwieweit paracrine Wechselwirkungen infolge der Somatostatinverminderung vorliegen, ist letztlich noch nicht geklärt.

Die in der Literatur beschriebenen Befunde, daß Cysteamin den Somatostatingehalt in zahlreichen Geweben senkt, müssen in Bezug auf die eigenen Ergebnisse auf zwei Kriterien, nämlich Konzentration und Einwirkungszeit, geprüft werden. In den Untersuchungen von Brown & al. (1983) ist nach 10 Minuten die Insulinsekretion, von Somatostatin antagonisierbar, erhöht. Die dazu verwendete Konzentration ist mit 300 mg/kg Cysteamin allerdings hoch. Da von Patel & Pierzchala (1983) ein Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mM bezüglich Wirkung auf Somatostatingehalt und Insulinsekretion untersucht wurde, ein verminderter Somatostatingehalt bei 1 stündiger Inkubation aber erst ab 0,3 mM Cysteamin, eine Erhöhung der Insulinsekretion erst ab 1 mM gemessen wurde, erhebt sich die Frage, ob bei den eigenen Versuchsbedingungen mit einer Cysteaminkonzentration von 0,1 mM und 10 minütiger Inkubationsdauer der Somatostatingehalt bereits derart erniedrigt sein kann, daß daraus eine erhöhte Sekretion des Insulins resultiert. Es könnte vielmehr spekuliert werden, daß kleine Konzentrationen des Cysteamins (0,1 - 1 mM) unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die Insulinsekretion über eine Beeinflussung des Glutathionsystems steigern, bei höheren Konzentrationen (1 - 3 mM) dagegen paracrine Effekte wirksam werden.

5.2.4.3. D-Penicillamin

D-Penicillamin verändert die Freisetzung von Insulin unter basalen Inkubationsbedingungen (2,8 mM Glucose) nicht. Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 - 2 mM ergeben 0,5 mM und 1 mM D-Penicillamin eine signifikante Steigerung der durch Glucose (11,1 mM) stimulierten Insulinsekretion (Abb.4.7, Tab.4.5). Quantitativ scheint die erzielte

Sekretionssteigerung um ca. 50 % des Glucosekontrollwertes geringer zu sein als bei Cysteamin (ca. 80 % ige Steigerung). Ein absoluter Vergleich ist allerdings nicht möglich, weil in verschiedenen Versuchsserien aufgrund unterschiedlicher Inselgröße ungleiche Sekretionsleistungen vorliegen können.

Bezüglich der Permeation von D-Penicillamin in Zellen liegen Befunde an Erythrozyten vor, wonach die Substanz nur langsam aufgenommen wird, die Membrangängigkeit also nur mäßig ist (Aaseth, 1976). Diese Beobachtung steht in Einklang mit Befunden, wonach der GSH-Gehalt in Zellen (Hepathozyten und Erythrozyten) nur bei Langzeitgabe (2 Wochen bzw. 2-8 Wochen peroral) erhöht wurde (Hassing & al., 1979; Munthe & al., 1979).

Nimmt man die an anderen Geweben beobachtete Permeabilität des D-Penicillamins auch für Inselzellen an, würde dies bedeuten, daß die Steigerung der Insulinsekretion durch extrazelluläre Membranwechselwirkung zustande käme. Insofern wäre der Wirkungsmechanismus von D-Penicillamin auch mit dem des reduzierten Glutathions vergleichbar, dessen Permeationsvermögen aufgrund der Tripeptidstruktur unwahrscheinlich scheint. Auch bezüglich Reaktivität und Stabilität sind die Substanzen ähnlich (3.5. und 5.2.2.).

5.2.4.4. N-Acetyl-D-Penicillamin

N-Acetyl-D-Penicillamin stimuliert die Insulinsekretion in Gegenwart von 2,8 mM Glucose in Konzentrationen von 1 mM und 2 mM. Bei diesen Konzentrationen wurde auch die durch Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion signifikant gesteigert (Abb.4.8, Tab.4.6).

Über Reaktivität und Stabilität der Substanz sind keine Befunde in der Literatur verfügbar. In eigenen Versuchen zur Stabilität der Substanz

konnte in albuminhaltigem Inkubationsmedium bei der Thiolbestimmung im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mM kein quantitativer Ausgangswert gemessen werden (zwischen 30 - 78 %, konzentrationsabhängig). Nach Abtrennung des Albumins verlief die Reaktion quantitativ, allerdings war die Reaktionszeit von ca. 15 Minuten auf 30 Minuten verlängert (s. 3.5). Die hohe Stabilität der Substanz ist wahrscheinlich durch die Einführung eines weiteren, die SH-Gruppe schützenden Substituenten verursacht und läßt niedrige Reaktivität vermuten. Daraus ist zweierlei ersichtlich:

1) In Gegenwart von Albumin scheint die SH-Gruppe des N-Acetyl-D-Penicillamins in ihrer Reaktivität mit SH-Reagentien behindert zu sein. Eine kovalente Bindung an Albumin kann nicht vorliegen, da N-Acetyl-D-Penicillamin nach Ausfällen und Abzentrifugieren des Albumins quantitativ im Überstand erfaßbar ist. Möglicherweise treten zwischen N-Acetyl-D-Penicillamin und funktionellen Gruppen nicht kovalente Bindungen auf. Solche Proteinbindung oder -assoziation könnte als sterische Hinderung für Thiolaustauschreaktionen fungieren. Dieser Sachverhalt erklärt somit auch, daß erst höhere Konzentrationen der Substanz (> 1 mM) die Insulinsekretion beeinflussen.

2) Die verlängerte Reaktionszeit bei 0,1 mM N-Acetyl-D-Penicillamin mit dem Disulfid (Ellmans Reagens) läßt auf eine schwache Reaktivität der Substanz als Thiol in diesem Konzentrationsbereich schließen.

In vitro-Versuche an Erythrozyten zeigten, daß N-Acetyl-D-Penicillamin bei 5 minütiger Inkubation mit einer 50 mmolaren Lösung rasch in die Zelle aufgenommen wird. Der intrazelluläre Nicht-Protein-SH-Anteil stieg dabei von 1,18 mM auf 9,28 mM. D-Penicillamin dagegen beeinflußte den Thiolgehalt der Zelle unter diesen Versuchsbedingungen nicht

(Aaseth, 1976).

Von N-Acetyl-D-Penicillamin wird angenommen, daß es von intrazellulären Enzymen nicht abgebaut wird (Aposhian, 1960, 1971). Eine intrazelluläre Wirkung der Substanz müßte also dem unveränderten Molekül zugeschrieben werden. Es wäre denkbar, daß in der Langerhansschen Insel eine Chelatbildung mit Zinkionen, welche für die Speicherung des Insulins von Bedeutung sind, eine veränderte Insulinsekretion bewirkt.

Über den Reaktionsmechanismus von N-Acetyl-D-Penicillamin können daher folgende Vermutungen angestellt werden:

1) N-Acetyl-D-Penicillamin geht in Konzentrationen < 1 mM Wechselwirkungen mit dem Albumin im Medium ein und steht daher anderen möglichen Reaktionen nur begrenzt zur Verfügung.

2) Bei höherer N-Acetyl-D-Penicillamin-Konzentration (1 mM, 2 mM) könnte die Albuminbindung soweit abgesättigt sein, daß darüberhinaus eine genügende Menge des Thiols zur spezifischen Wirkung auf die Insulinsekretion verfügbar ist.

3) Die Beeinflussung der Insulinsekretion durch N-Acetyl-D-Penicillamin unterscheidet sich von der durch GSH, Cysteamin und D-Penicillamin bewirkten dadurch, daß N-Acetyl-D-Penicillamin bei substimulatorischer Glucosemenge (2,8 mM) zur Stimulation der Hormonsekretion führt. Es muß daher ein anderer Wirkungsmechanismus und/oder weitere Wirkungen der Substanz vermutet werden. Diese Annahme, daß N-Acetyl-D-Penicillamin mehrere Zellfunktionen beeinflußt, wird dadurch unterstützt, daß bei 3 mM N-Acetyl-D-Penicillamin die stimulatorische Wirkung weiter anhält, während keine Steigerung der glucoseinduzierten Insulinsekretion mehr auftritt, vielmehr ein starker Abfall der Kurve zum Ausgangsniveau zu beobachten ist. Da N-Acetyl-D-Penicillamin im Gegensatz

zu D-Penicillamin gut membrangängig ist und vermutlich rasch in die Zelle aufgenommen wird (Aaseth, 1976), könnte weiter spekuliert werden, daß die modulierende Wirkung auf die Insulinsekretion auf extrazelluläre Membraneffekte zurückzuführen ist, während die Stimulation der Insulinsekretion durch intrazelluläre Reaktionen zustande kommt.

4) Als letzte Möglichkeit müßten toxische Reaktionen auf die Zellmembran mit folgendem Leakage in Betracht gezogen werden. Diese könnten auch durch die chelatbildenden Eigenschaften der Substanz verursacht werden. Wie Untersuchungen an Mäusen aber gezeigt haben, ist N-Acetyl-D-Penicillamin weit weniger toxisch als D-Penicillamin. Bei Gabe von N-Acetyl-D-Penicillamin in einer Menge, welche 10 fach über der bei D-Penicillamin letalen Dosis liegt, konnte keine Toxizität beobachtet werden (Aaseth, 1976).

Eine genaue Klärung des Wirkungsmechanismus, über welchen N-Acetyl-D-Penicillamin die Insulinsekretion stimuliert, bedürfte also weiterer Untersuchungen zum Einfluß der Substanz auf Rubidiumefflux und Calciuminflux.

5.2.4.5. Einfluß der Disulfide: Cystin, Cystamin, D-Penicillamin-disulfid auf die durch Glucose induzierte Insulinsekretion

Cystamin (2 mM) und D-Penicillamin-disulfid (0,5 mM) haben in Gegenwart von 2,8 mM und 11,1 mM Glucose keinen Einfluß auf die Insulinsekretion. Cystin (5 mM) dagegen hemmt signifikant die Freisetzung des Hormons nach Glucosestimulation nicht dagegen die Basalsekretion bei 2,8 mM Glucose (Abb.4.9, Tab. 4.7). Auch Hellman & al. (1975b) berichtete, daß GSSG im Gegensatz zu GSH die Menge sezernierten Insulins nicht erhöht.

Cystin wird als Aminosäure vermutlich aktiv in die Zellen transpor-

tiert. Im Homogenat Langerhansscher Inseln wurde Glutathion-Cystin-Transhydrogenaseaktivität nachgewiesen, welche im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben in Insel- und Muskelgewebe bedeutend höher war (Anjaneyulu & al., 1982). Die Insel verfügt also über ein spezifisches Enzym zur Reduktion von Cystin zu Cystein. Dabei wird GSH verbraucht. Die Ursache einer Hemmung der Insulinsekretion durch Cystin könnte also die Verminderung des intrazellulären GSH-Gehaltes sein.
Für andere Disulfide existieren intrazellulär unspezifische Redoxsysteme, welche letzlich zum Verbrauch von NADPH oder GSH führen. Möglicherweise würden daher auch Cystamin und D-Penicillamin-disulfid in höheren Konzentrationen zur Hemmung der Insulinsekretion führen.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, daß bei den verwendeten Substanzen die SH-Gruppe ausschlaggebend für die erzielte Sekretionssteigerung des Insulins ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei Fragenkomplexe untersucht werden:

1.1. Bei Stimulatoren der Insulinsekretion, welche durch exogenes GSH und Diamid in der, in einer früheren Arbeit verwendeten, Dosis von 0,1 mM in ihrer Sekretionsleistung unverändert blieben, sollte geklärt werden, ob ihre fehlende Beeinflußbarkeit durch exogenes GSH qualitativer oder quantitativer Natur ist, da möglicherweise doch höhere oder niedrigere GSH-Dosen wirksam sein könnten.

1.2. Weiterhin sollte geprüft werden, ob auch andere Thiole, und zwar Cystein und Cysteinderivate, wie GSH die glucoseinduzierte Insulinsekretion zu steigern vermögen.

1.1.1. Für die Stimulatoren Ca-Ionophor 23187 und Glibenclamid sollte zunächst mit GSH (0,1 mM) und Diamid (0,1 mM) untersucht werden, ob ihre insulinfreisetzende Wirkung wie die der Glucose thiolabhängig ist.

1.1.2. Durch Dosis-Wirkungskurven im Konzentrationsbereich von 0,05 - 2 mM GSH sollte festgestellt werden, ob die Sekretionsleistung der Stimulatoren Ca-Ionophor 23187, Glibenclamid, Glucagon, db-cAMP und Isoprenalin durch eine höhere oder niedrigere GSH-Konzentration, als die bei thiolabhängigen Stimulatoren (Glucose, Glyceraldehyd, Leucin, Tolbutamid) wirksame (0,1 mM GSH), beeinflußt wird.

1.2.1. Für die Thiolkomponente des Glutathions, Cystein, und einige seiner Derivate (Cysteamin, D-Penicillamin, N-Acetyl-D-Penicillamin) sollten an isolierten Langerhansschen Inseln Dosis-Wirkungsbeziehungen

hinsichtlich ihrer synergistischen Wirkung auf die Glucose (11,1 mM)-induzierte Insulinsekretion erstellt werden.

1.2.2. Durch zusätzliche Stabilitätsmessungen der Substanzen sollte nach Gesetzmäßigkeiten zwischen strukturellen Veränderungen der Grundkomponente Cystein, der Oxidationsempfindlichkeit bzw. Reaktivität und der Wirkung auf die Insulinsekretion gesucht werden.

1.2.3. Durch Inkubation Langerhansscher Inseln mit den entsprechenden Disulfiden Cystin, Cystamin und D-Penicillamin-disulfid in der potenzierenden Konzentration des jeweiligen Thiols sollte die Bedeutung der SH-Gruppe gezeigt werden.

6.2. Versuchsergebnisse

2.1. Thiolabhängigkeit der untersuchten Stimulatoren

2.1.1. Weder GSH (0,1 mM) noch das Thioloxidans Diamid (0,1 mM) beeinflußten die durch Ca-Ionophor 23187 oder Glibenclamid plus Glucose (11,1 mM) stimulierte Insulinsekretion.

2.1.2. Bei den Stimulatoren Ca-Ionophor 23187, Glibenclamid, db-cAMP und Isoprenalin wurde durch GSH im Konzentrationsbereich von 0,05 - 2 mM keine Steigerung der Insulinsekretion gemessen. Der durch Glucagon beobachtete schwache, nicht signifikante Anstieg der freigesetzten Insulinmenge wurde durch 1 mM GSH signifikant erhöht.

2.2. Einfluß der untersuchten Thiole auf die Insulinsekretion

2.2.1. Cystein stimulierte in Konzentrationen von 4, 6 und 7 mM die Insulinsekretion unter Basalbedingungen (2,8 mM Glucose). Die Zunahme des sezernierten Insulins beträgt 33, 83, 83 µU/ml/5 Inseln/10 min. In Gegenwart von 11,1 mM Glucose wurde die Menge sezernierten Insulins konzentrationsabhängig durch 3 - 7 mM Cystein um 75, 99, 125, 162 und

191 µU/ml/5 Inseln/10 min gesteigert.

2.2.2. Cysteamin (0,1 - 3 mM) veränderte den Basalinsulinlevel bei 2,8 mM Glucose nicht. Die durch 11,1 mM Glucose stimulierte Insulinsekretion wurde durch 0,1 mM Cysteamin signifikant um 71 µU/ml/5 Inseln/10 min gesteigert. Höhere Cysteaminkonzentrationen erzielten quantitativ die gleiche Wirkung wie 0,1 mM Cysteamin (Zunahme um 70, 80, 79, 79 µU/ml/5 Inseln/10 min).

2.2.3. Bei substimulatorischer Glucosemenge (2,8 mM) konnte durch D-Penicillamin (0,1 - 2 mM) keine Stimulation der Insulinsekretion beobachtet werden. D-Penicillamin führt in diesem Konzentrationsbereich zu einem Anstieg der durch 11,1 mM Glucose induzierten Insulinsekretion, wobei das Maximum der Steigerung zwischen 0,5 mM und 1 mM erreicht war. Im Vergleich zum Kontrollwert wurden durch 0,1 mM D-Penicillamin zusätzlich 9 µU, durch 0,5 mM 28 µU, durch 1 mM um 27 µU, durch 2 mM um 16 µU IRI/ml/5 Inseln/10 min sezerniert.

2.2.4. N-Acetyl-D-Penicillamin (0,1 - 3 mM) steigert die Insulinsekretionsrate bei 1 mM und 2 mM in Gegenwart von 2,8 mM und 11,1 mM Glucose. Der maximale Effekt ist bei beiden Glucosekonzentrationen durch 2 mM des Thiols erreicht (Zunahme des sezernierten IRI um 47 µU bzw. 60 µU/ml/5 Inseln/10 min).

2.2.5. Alle getesteten Disulfide (Cystin, Cystamin, D-Penicillamin-disulfid) zeigten bei 2,8 mM Glucose keine Veränderung des Basalinsulinwertes. Nach Glucosestimulation hemmte Cystin die Freisetzung des Insulins, Cystamin und D-Penicillamin-disulfid hatten in der untersuchten Konzentration keine Wirkung.

2.2.6. Die Stabilität der Substanzen, gemessen durch die Abnahme des DTNB-reaktiven Thiolgehalts im Inkubationsmedium in Abhängigkeit von der Zeit, nimmt in der Reihenfolge: Cysteamin < Cystein < D-Penicilla-

min < GSH < N-Acetyl-D-Penicillamin zu.

2.2.7. Das oxidationsempfindlichste Thiol, Cysteamin, zeigt die größte Wirksamkeit als Modulator der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

6.3. Schlußfolgerungen

3.1. Thiolabhängigkeit der untersuchten Stimulatoren

3.1.1. Es konnte eine Unterscheidung in thiolabhängige und nicht thiolabhängige Stimulatoren der Insulinsekretion bestätigt werden.

3.1.2. Stimulatoren, welche die Erhöhung des cytosolischen Calciumgehalts durch intrazelluläre Umverteilung (Isoprenalin, db-cAMP) oder ionophoretischen Calciumeinstrom (Ca-Ionophor 23187) bewirken, sind in ihrer Sekretionsleistung durch exogenes GSH nicht zu beeinflussen.

3.1.3. Aufgrund des Unterschiedes von Tolbutamid und Glibenclamid bezüglich der Thiolabhängigkeit kann ein ungleicher Wirkungsmechanismus der beiden Sulfonylharnstoffe vermutet werden. Die Befunde mit Glibenclamid unterstützen die Theorie einer Ionophorwirkung von Sulfonylharnstoffen.

3.2. Einfluß der untersuchten Thiole auf die Insulinsekretion

3.2.1. Durch Cystein und einige seiner Derivate kann die Sekretion von Insulin erhöht werden.

3.2.2. Dabei können die untersuchten Substanzen in stimulierende Thiole (Cystein, N-Acetyl-D-Penicillamin) und modulierende Thiole (Cysteamin, D-Penicillamin) unterschieden werden. Die modulierende Wirkung der Thiole findet bei niedriger Thiolkonzentration (<0,5 mM) statt, während eine Stimulation der Sekretion erst bei höheren Thiolkonzentrationen sichtbar wird (> 1 mM).

3.2.3. Disulfide zeigen keine Wirkung auf die Insulinfreisetzung

(Cystamin, D-Penicillamin-disulfid) oder hemmen diese (Cystin). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Thiolfunktion bei der beobachteten Wirkung auf die Insulinsekretion.

3.2.4. Es scheint, daß auch andere Thiole mit einer Cysteinkomponente im Molekül außer GSH dessen Funktion der Reduktion von B-zellulären Membranthiole übernehmen können. Da es sich um niedermolekulare Substanzen handelt, könnten die zugeführten Thiole den Redoxstatus der B-Zellmembranthiole durch intrazelluläre Unterstützung des GSH-Redoxsystems und/oder wie GSH durch direkte exogene Wechselwirkung mit Membran-SH-Gruppen beeinflussen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aaseth, J. (1976):
Mobilization of methyl mercury in vivo and in vitro using N-acetyl-DL-penicillamine and other chelating agents.
Acta Pharmacol. et Toxicol. 39, 289

Abdel Hamid, M.A.(1983):
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Tübingen

Adelstein, R.S., Eisenberg, E. (1980):
Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction.
Ann. Rev. Biochem. 49, 921-956

Agren, A., Berne, C., Brolin, S.E. (1978):
The activity of glutathione reductase in A2-cell and B-cell-rich pancreatic islets.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 427-429

Ammon, H.P.T. (1975):
Effect of tolbutamide on aminophylline-, 3,5-AMP-dibutyrate- or glucagon-induced insulin release from rat pancreatic islets after impairment of pyridine nucleotide metabolism caused by 6-amino-nicotinamide (6-AN).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 251-264

Ammon, H.P.T., Abdel Hamid, M. (1981):
Potentiation of the insulin-releasing capacity of tolbutamide by thiols: studies on the isolated pancreas.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317, 262-267

Ammon, H.P.T., Abdel Hamid, M., Rao, P.G., Enz, G. (1984a):
Thiol-dependent and non-thiol-dependent stimulations of insulin release.
Diabetes 33, 251

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A., Niklas, H. (1979a):
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96

Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H., Hegner, D. (1977):
Inhibition of p-chloromercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert.-butylhydroperoxide.
Mol. Pharmacology 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Amm, U., Eujen, R., Hoppe, E., Trier, G., Verspohl, E.J. (1984b):
The role of old age in the effects of glucose on insulin secretion, pentosephosphate shunt activity, pyridine nucleotides and glutathione of rat pancreatic islets.
Life Science 34, 247-257

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980):
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Hägele, R., Youssif, N., Eujen, R., El-Amri, N. (1983):
A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release.
Endocrinology 112, 720-726

Ammon, H.P.T., Heinzl, S., Abdel Hamid, M., Kallenberger, H.-M., Hagenloh, I. (1982):
Effect of diamide and reduced glutathione on elevated levels of cyclic AMP in rat pancreatic islets exposed to glucose, p-chloromercuribenzoate and aminophylline.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319, 243-248

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H. (1979b):
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released - interaction in vitro with methylene blue, thiol oxidants, and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T., Steinke, J. (1972a):
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in the rat.
Diabetes 21, 143-148

Ammon, H.P.T., Steinke, J. (1972b):
Effect of 6-aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline.
Endocrinology 91, 33

Ammon, H.P.T., Verspohl, E.J. (1979):
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41-44

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976):
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Anderson, M.E., Meister, A. (1983):
Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 707-711

Anjaneyulu, R., Anjaneyulu, K., Couturier, E., Malaisse, W.J. (1980):
Opposite effects of hypoglycemic and hyperglycemic sulfonamides upon ionophore-mediated calcium transport.
Biochem. Pharmacol. 29, 1879-1882

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1982):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Thiol:disulfide balance in pancreatic islets.
Biochimie 64, 29-36

Aposhian, H.V. (1960):
Penicillamine and its analogues; metabolic properties and oral activities against the letal effects of mercuric chloride.
In: Metal-binding in medicine. Ed.: Seven, M.J.; J.P. Lippincott Co. Philadelphia, Pa., pp. 290-295

Aposhian, H.V. (1971):
Penicillamine and analogues chelating agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 179, 481-486

Ashcroft, S.J.H. (1976):
The control of insulin release by sugars.
Ciba Found Symp. 41, 117-139

Ashcroft, S.J.H. (1980):
Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Ashcroft, S.J.H., Christie, M.R. (1979):
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 184, 697

Ashcroft, S.J.H., Hedescov, C.J., Randle, P.J. (1970):
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 143-154

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J. (1975):
The pancreas and insulin release.
In: Diabetes. Its physiological and biochemical basis, edited by J. Vallance-Owen. Lancester: MTP Press, 31-62

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Täljedal, I.-B. (1972):
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.
Febs Lett 20, 263-266

Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Randle, P.J. (1973):
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231

Ball, C.R. (1966):
Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: Relevance to protection against nitrogen mustards.
Biochem. Pharmacol. 15, 809

Barron, E.S.G. (1951):

Thiol groups of biological importance.
Adv. Enzymol. 11, 201-206

Bartlett, D.C., Scheele G.A. (1980):
Calmodulin and calmodulin-binding proteins in canine pancreas.
In: Calmodulin and cell function.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 356, 356-357

Bindoli, A., Cavallini, L., Siliprandi N. (1977):
Effect of thiol oxidation on lipid peroxidation in rat liver mitochondria.
Chem. Biol. Interact. 19, 383-386

Birnbaum, S.M., Winitz, M., Greenstein, J.P. (1957):
Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. III. Individual amino acids as sources of "non-essential" nitrogen.
Arch. Biochem. Biophys. 72, 428-436

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1972):
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic B-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254

Boschero, A.C., Malaisse, W.J. (1979):
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of 86Rb(+) efflux from pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 236, E139-E146

Brisson, G.R., Malaisse, W.J. (1973):
The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. XI. Effects of theophylline and epinephrine on 45Ca(2+) efflux from perifused islets.
Metabolism 22, 456-465

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: VII. A proposed site of action for adenosine-3',5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Brown, M.R., Fisher, L.A., Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Vale, W.W. (1983):
Biological effects of cysteamine: relationship to somatostatin depletion.
Regulatory Peptides 5, 163-179

Burr, I.M., Balant, L., Stauffacher, W., Renold A.E. (1971):
Adrenergic modification of glucose-induced biphasic insulin release from perifused rat pancreas.
Europ. J. Clin. Invest. 1, 216-224

Cehovic, G., Posternak, T., Charollais, E. (1972):
A study of the biological activity and resistance to phosphodi-

esterase of some derivatives and analogues of cyclic AMP.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 1, 521

Charles, M.A., Fanska, R., Schmid, F.G., Forsham, P.H., Grodsky, G.M. (1973):
Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: Glucose-induced insulin release.
Science 179, 569-571

Charles, M.A., Lawecki, J., Pictet, R., Grodsky, G.M. (1975):
Insulin secretion. Interrelationship of glucose, cyclic 3':5' adenosine monophosphate and calcium.
J. Biol. Chem. 250, 6134-6140

Charles, M.A., Lawecki, I., Steiner, A.D., Grodsky, G.M. (1976):
Cyclic nucleotides in pancreatic islets. Tolbutamide and arginine-induced insulin release.
Diabetes 25, 256-259

Chasseaud, L.F. (1979):
The role of glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electric agents.
Adv. Cancer Res. 29, 175-274

Christophersen, B.O. (1968):
The inhibitory effect of reduced glutathione on lipid peroxidation of the microsomal fraction and mitochondria.
Biochem. J. 106, 515

Cikryt, P. (1979):
Diplomarbeit,
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Tübingen

Conaway, H.H., Griffey, M.A., Marks, S.R., Whitney, J.E. (1976):
Ionophore A 23187-induced insulin secretion in isolated perfused dog pancreas.
Horm. Metab. Res. 8, 351-353

Cooper, A.J.L. (1983):
Biochemistry of sulfur-containing amino acids.
Ann. Rev. Biochem. 52, 187-222

Cooper, A.J.L., Haber, M.T., Meister, A. (1982):
On the chemistry and biochemistry of 3-mercaptopyruvic acid, the alpha-keto acid analog of cysteine.
J. Biol. Chem. 257, 816-26

Coore, H.G., Randle, P.J. (1964):
Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem. J. 93, 66-78

Couturier, E., Malaisse, W.J. (1980):
Insulinotropic effects of hypoglycaemic and hyperglycaemic sulphonamides: The ionophoretic hypothesis.

Diabetologia 19, 335-40

Crawhall, J.C., Segal, S. (1967):
The intracellular ratio of cysteine and cystine in various tissues.
Biochem. J. 105, 891-96

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968):
Requirement for calcium ion in insulin secretion by perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214, 174-178

Czech, M.P. (1976):
Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and desactivation of the fat cell hexose transport system.
J. Biol. Chem. 251, 1164-1170

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1968):
Electrical activity in pancreatic islet cells.
Nature London 219, 389-390

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1970):
Electical activity in pancreatic islet cells: effect of ions.
J. Physiol. London 210, 265-275

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1972):
The bioelectric properties of pancreatic islets cells: effect of diabetogen agents.
Diabetologia 8, 173-178

Deleers, M., Brasseur, R., Gelbcke, M. (1981):
Homologous and hybrid calcium complexes of A 23187 and hypoglycaemic sulfonylureas nuclear magnetic resonance and conformational analysis.
Diabetologia 21, 263 (Abstract)

Dormer, R.L., Kerbey, A.L., McPherson, M., Manley, S., Ashcroft, S. J.H., Schofield, J.G., Randle, P.J. (1974):
The effect of nickel on secretory systems. Studies on the release of amylase, insulin and growth hormone.
Biochem. J. 140, 135-142

Efendic, S., Grill, V., Nylen, A., Östensson, C.-G. (1982):
Difference in calcium dependency of insulin, glucagon and somatostatin secretion in response to glibenclamide in perfused rat pancreas.
Diabetologia 22, 475-479

Ellman, G.L. (1959):
Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys 82: 70-77

Erlichman, J., Schubart, U., Fleischer, N. (1979):
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and 45Ca(2+) fluxes in Syrian hamster insulinoma cells.
Endocrinology 105, 1183-1190

Estler, C.J., Ammon, H.P.T. (1966):
Glutathion und SH-gruppenhaltige Enzyme in der Leber weißer Mäuse nach einmaliger Alkoholgabe.
Med. Pharmacol. exp. 15, 299-306

Fahey, R.C. (1977):
Biologically important thiol-disulfide reactions and the role of Cyst(e)ine in proteins: an evolutionary perspective.
Adv. Exp. Med. Biol. 86a, 1-30

Feldman, J.M., Boyd III, A.E., Lebovitz, H.E. (1971):
Structural determinants of catecholamine action on in vitro insulin release.
J. Pharmacol. Experim. Therap. 176, 611-621

Finkelstein, J.P., Kyle, W.E., Harris, B.J., Martin, J.J. (1982):
Methionine metabolism in mammals: Concentration of metabolites in rat tissues.
J. Nutr. 112, 1011-18

Flohé, L., Günzler, W.A. (1974):
Glutathione peroxidase.
in: Glutathione. Proc. 16th Conf. German Soc. Biol. Chem.
Flohe, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. (eds.)
pp. 132-45

Flohé, L., Günzler, W.A. (1976):
Glutathione-dependent enzymatic oxidoreduction reactions.
In: Glutathione: metabolism and function (Arias, J.M., Jacoby, W.B., eds.), Ravens Press, New York, pp. 17-34

Gaitonde, M.K. (1967):
A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occuring amino acids.
Biochem. J. 104, 627-33

Gazzard, B.G., Hughes, R.D., Portmann, B., Dordoni, B., Williams, R. (1974):
Protection of rats against the hepatotoxic effect of paracetamol.
Brit. J. Exp. Path. 54, 601

Gerich, J.E., Lovinger, R., Grodsky, G.M. (1975):
Inhibition by somatostatin of glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas in response to arginine, isoproterenol and theophylline: Evidence for a preferential effect on glucagon secretion.
Endocrinology 96, 749

Gilbert, H.F. (1982):
Biological disulfides: the third messenger? Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange.
J. Biol. Chem. 257, 12086-12091

Goldfine, I.D., Perlman, R., Roth, J. (1971):
Inhibition of cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase in islet cells

and other tissues by tolbutamide.
Nature 234, 295-297

Gomori, G. (1950):
A new stain for elastic tissue.
Amer. J. Clin. Path. 20, 665

Goodman, L.S., Gilman, A. (1980):
The Pharmacological Basis of Therapeutics.
6 th. edition
MacMillan Publishing Co., Inc., New York, Toronto, London

Grodsky, G.M., Bennett, L.L. (1966):
Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas.
Diabetes 15, 910-913

Grodsky, G.M., Batts, A., Bennett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B., Smith, D.F. (1963):
Effect of carbohydrate on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Amer. J. Physiol. 205, 638-644

Hägele, R.G. (1981):
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Tübingen

Hahn, H.-J., Gylfe, E., Hellman, B. (1980):
Calcium and pancreatic ß-cell function: 7. Evidence for cyclic AMP-induced translocation of intracellular calcium.
Biochem. Biophys. Acta 630, 425-432

Hahn, R., Oberrauch, W. (1978):
Unidirectional tranport of reduced glutathione in rat liver and its metabolization in the extracellular space.
in: Functions of glutathione in liver and kidney. Proc. Life Sci., Sies, H., Wendel, A. (eds.), Springer-Verlag

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949):
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissue by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Harding, J.J. (1969):
Glutathione protein mixed disulfides in human lens.
Biochem. J. 114, 88-89

Harrap, K.R., Jackson, R.C., Riches, P.G., Smith, C.A., Hill, B.T. (1973):
The occurence of protein-bound mixed disulfides in rat tissues.
Biochim. Biophys. Acta 310, 104-110

Hassing, J.M., Hupka, A.L., Stohs, S.J., Yoon, P.C. (1979):
Hepatic glutathione levels in D-Penicillamine-fed ethanol-dependent rats.

Res. Com. Chem. Path. Pharm. 25, 389-394

Heinle, H., Sawatzki, G., Wendel, A. (1976):
Glutathionbiosynthese. VII. Die Biosynthese von Glutathion in Humanerythrocyten.
Hoppe-Seyler's Zeit., Physiolog. Chem. 357, 1451

Heinzl, S. (1979):
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Tübingen

Hellerström, C. (1967):
Effects of carbohydrates on the oxygen consumption of isolated pancreatic islets of mice.
Endocrinology 81, 105-112

Hellman, B.(1975a):
The effect of divalent ionophores on the stability of isolated insulin secretory granules.
Febs. Lett. 54, 343-346

Hellman, B. (1975b):
Modifying actions of calcium ionophore on insulin release.
Biochim. Biophys. Acta 399, 157

Hellman, B. (1981):
Tolbutamide stimulation of 45Ca fluxes in microdissected pancreatic islets rich in ß-cells.
Moleculár Pharmacol. 20, 83-88

Hellman, B (1982):
Differences between the effect of tolbutamide and Ca(2+)-ionophores on Ca(2+) efflux from rat pancreatic ß-cells.
Pharmacol. Res. Commun. 14, 701

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973a):
Iodoacetamide-induced sensitization of pancreatic B-cells to glucose stimulation.
Biochem. J. 132, 775-789

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973b):
Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly permeating disulphides.
Mol. Pharmacol. 9, 792-801

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974a):
The pancreatic beta-cell recognition of insulin secretagogues. VIII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 448-457

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal,

I.-B. (1974b):
Membrane sulphydryl groups and pancreatic beta cell recognition of insulin secretagogues.
in: Diabetes (Malaisse, W.J. and Priart, J. eds.), pp. 65-78, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1975b):
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta 392, 101-109

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1971):
The pancreatic recognition of insulin secretagogues. II. Site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1384-1388

Hellman, B., Lenzen, S., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1977):
Effect of various modifiers of insulin release on the lanthanum-nondisplaceable 45Ca(2+) uptake by isolated pancreatic islets.
Diabetologia 13, 49-53

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973c):
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. IV. Islet uptake of sulfonylureas.
Diabetologia 9, 210-216

Hellman, B., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1975a):
The mechanism of action of chloromercuribenzene-p-sulphonic acid as insulin secretagogue: fluxes of calcium, sodium, and rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol. 252, 701

Henquin, J.C. (1977):
Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 551-556

Henquin, J.C. (1978a):
D-Glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells.
Nature 271, 271-273

Henquin, J.C. (1978b):
Relative importance of extracellular and intracellular calcium for the two phases of glucose-stimulated insulin release: studies with theophylline.
Endocrinology 102, 723-730

Henquin, J.C. (1980a):
Metabolic control of potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J. 186, 541-550

Henquin, J.C. (1980b):
Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanism in isolated rat islets.
Diabetologia 18, 151-160

Henquin, J.C. (1981):
Effects of trifluoperazine and pimozide on stimulus-secretion coupling in pancreatic ß-cells.
Biochem. J. 196, 771-780

Henquin, J.C., Lambert, A.E. (1974):
Study of the mechanisms of cobalt Co(2+)-induced inhibition of immunoreactiv insulin (IRI) release.
Diabetologia 10, 368-369

Henquin, J.C., Lambert, A.E. (1975):
Inhibition by cobalt of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets.
Amer. J. Physiol. 228, 1669-1677

Henquin, J.C., Meissner, H.P. (1978):
Valinomycin inhibition of insulin release and alteration of electrical properties of pancreatic beta-cells.
Biochim. Biophys. Acta 543, 455-464

Howell, S.L., Montague, W. (1973):
Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans. Effects of agents which alter rates of insulin secretion.
Biochim. Biophys. Acta 320, 44-52

Howell, S.L., Montague, W., Tyhurst, M. (1975):
Calcium distribution in islets of Langerhans: a study of calcium concentrations and of calcium accumulation in B-cell organelles.
J. Cell. Sci. 19, 395-409

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1980):
Regulation of actin polymerization in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 192, 381-383

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1981):
Actomyosin interaction with isolated ß-granules.
Diabetologia 21, 284 (Abstract)

Howell, S.L., Tyhurst, M. (1982):
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301-308

Huisman, T.H.J., Dozy, A.M. (1962):
Heterogeneity of hemoglobin with oxidized glutathione.
J. Lab. Clin. Med. 60, 302-319

Isaacs, I., Binkley, F. (1977):
Glutathione dependent control of protein disulfide-sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue.
Biochim. Biophys. Acta 497, 192-204

Jarrett, R.J., Keen, H. (1966):
Glucose metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans.
Lancet I, 633-635

Jellum, E., Skredes, P. (1976):
Biological aspects of thiol-disulfid reactions during treatment with penicillamine.
in: Penicillamine research in rheumatic disease. Oslo 1976, S. 68-79

Jewell, S.A., Bellomo, G., Thor, H., Orrenius, S., Smith, M. (1982):
Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis.
Science 217, 1257-9

Jocelyn, P.C. (1972):
Biochemistry of the SH-Group.
Academic Press, London, New York

Jollow, D.J., Mitchell, J.R., Potter, W.Z., Davis, D.C., Gilette, J.R., Brodie, B.B. (1973):
Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 195-202

Kawazu, S., Sener, A., Couturier, E., Malaisse, W.J. (1980):
Metabolic, cationic and secretory effects of hypoglycemic sulfonylureas in pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 312, 277-83

Kohashi, N., Yamaguchi, Y., Hosokawa, Y., Kori, Y., Fujii, O., Ueda, I. (1978):
Dietary control of cysteine dioxygenase in rat liver.
J. Biochem. 84, 159

Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J., Kosower, N.S. (1972):
Glutathione. VII. Differentiation among substrates by the thiol oxidizing agent diamide.
Biochim. Biophys. Acta 264, 39-44

Kosower, E.M., Kanety-Londner, H. (1976):
Glutathione. XIII. Mechanism of thiol-oxidant by diazene-dicarboxylic acid derivatives.
Am. Chem. Soc. 98, 3001

Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1974):
Protection of membranes by glutathione.
in: Glutathione, Proc. 16th Conf. German Soc. Biol. Chem. Tübingen.
Flohe, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. (eds.)
pp. 216-227

Kosower, N.S., Kosower, E.M. (1976):
Functional aspects of glutathione disulfide and hidden forms of glutathione.
in: Glutathione: Metabolism and function (eds.: Arias, I.M., Jacoby, W.B.), Ravens Press, New York, 159-172

Kosower, E.M., Kosower, N.S., Kanety-Londner H., Levy L. (1974):
Glutathione. IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP+1, DIP+2.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 347

Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B., Correa, W. (1969):
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593-596

Kosower, N.S., Zipser, Y., Faltin, Z. (1982):
Membrane thiol-disulfide status in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells. Relationship to cellular glutathione.
Biochim. Biophys. Acta 691, 345-352

Krausz, Y., Wollheim, C.B., Siegel, E., Sharp, G.W.G. (1980):
Possible role for calmodulin in insulin release: studies with trifluoperazin in rat pancreatic islets.
J. Clin. Invest. 66, 603-607

Krebs, H.A., Hems, R., Tyler, B. (1976):
The regulation of folate and methionine metabolism.
Biochem. J. 158, 341-53

Kuo, W.-N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F. (1974):
Regulation by various hormones and agents of adenosine-3',5'-monophosphate levels in islets of Langerhans of rats.
Biochem. Pharmacol. 23, 1387

Lacy, P.E., Howell, S.L., Young, D.A., Fink, C.J. (1968):
New hypothesis of insulin secretion.
Nature 219, 1177-1179

Lacy, P.E., Klein, N.J., Fink, C.J. (1973):
Effect of cytochalasin B on the biphasic release of insulin in perifused rat islets.
Endocrinology 92, 1458-1468

Lacy, P.E., Kostianowski, M. (1967):
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Landgraf-Leurs, M.M.C., Mayer, L., Landgraf, R. (1978):
Sulphydryl requirement for insulin release from the perfused pancreas. Studies with ethacrynic acid and dithiothreitol.
Diabetologia 15, 337-342

Levey, G.S., Schmidt, W.M.I., Mintz, D.H. (1972):
Activation of adenylcyclase in a pancreatic islet cell adenoma by glucagon and tolbutamide.
Metabolism 21, 93-98

Lichtenberger, L.M., Szabo, S., Trier, J.S. (1977):
Duodenal ulcerogens, cysteamine and propionitrile, stimulate serum gastrin levels in the rat.
Gastroenterology 73, 1305-1308

Little, C., O'Brien, P.J. (1968):

An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxidase substrate.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 145

Lorenson, M.Y., Jacobs, L.S. (1982):
Thiol regulation of protein, growth hormone, and prolactin release from isolated adenohypophysial secretory granules.
Endocrinology 110, 1164-1172

Loubatieres, A., Mariani, M.M., Chapal, J. (1970):
Insulino-secretion etudiee sur le pancreas isole et perfuse du rat II. Action des catecholamines et des substances bloquant les recepteurs adrenergiques.
Diabetologia 6, 533-541

Loubatieres, A., Mariani, M.M., Sorel, G., Savi, L. (1971):
The action of ß-adrenergic blocking and stimulating agents on insulin secretion. Characterization of the type of ß receptor.
Diabetologia 7, 127-132

MacDonald, C.M., Dow, J., Moore, M.R. (1977):
A possible protective role for sulphhydryl compounds in acute alcoholic liver injury.
Biochem. Pharmacol. 26, 1529-1531

Malaisse, W.J. (1973a):
Insulin secretion: multifactorial regulation for a process of release.
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse, W.J. (1973b):
Effect of glibenclamide upon 45Calcium efflux from perfused islets.
Arch. Inter. de Pharmacodynamie et de Ther. 203, 403

Malaisse, W.J., Brisson, G., Malaisse-Lagae, F. (1970):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. I. Interaction of epinephrine and alkaline earth cations.
J. Lab. Clin. Med. 76, 895

Malaisse, W.J., Devis, G., Pipeleers, D.G., Somers, G., Van Obberghen, E. (1974):
Glucose metabolism and insulin release: the role of glyceraldehyde.
Diabetologia 10, 379

Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D.G., Devis, G., Somers, G., Van Obberghen, E. (1976):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XIX. The insulinotropic effect of glyceraldehyde.
Mol. Cell. Endocrinol. 4, 1-12

Malaisse, W.J., Lea, M.A., Malaisse-Lagae, F. (1968):
The effect of mannoheptulose on the phosphorylation of glucose and the secretion of insulin by islets of Langerhans.
Metabolism 17, 126-132

Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D. (1967a):

A possible role for the adenylcyclase system in insulin secretion.
J. Clin. Invest. 46, 1724-34

Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F., Wright, P.H., Ashmore, J. (1967b):
Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion in vitro.
Endocrinology 80, 975-978

Malaisse, W.J., Sener, A., Boschero, A.C., Kawazu, S., Devis, G., Somers, G. (1978):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas.
Eur. J. Biochem. 87, 111-120

Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1971):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. III. Uptake of 45calcium by isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88, 72-80

Mannervik, B., Axelsson, K. (1978):
The roles of glutathione, thioltransferase, and glutathion reductase in the scission of sulfur-sulfur bonds.
in: Functions of glutathione in liver and kidney (Sies, H., Wendel, A., eds.) pp. 148-153, Springer-Verlag, Berlin

Mannervik, B., Axelsson, K. (1980):
Role of cytoplasmatic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulfide interchange.
Biochem. J. 190, 125-130

Mannervik, B., Eriksson, S.A. (1974):
Enzymatic reduction of mixed disulfides.
in: Glutathione. Proc. 16th Conf. German Soc. Biol. Chem. Tübingen.
Flohe, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. (eds)
pp. 120-32

Martindale: The Extra Pharmacopoeia
Twenty-eighth Edition (1982)
Reynolds J.E.F., Prasad, A.B. (eds.)
The Pharmaceutical Press, London

McLaughlin, S., Eisenberg, M. (1975):
Antibiotics and membrane biology.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 335

Meissner, H.P. (1976):
Electrical characterisation of the beta-cells in pancreatic islets.
J. Physiol. (Paris) 72, 757-767

Meissner, H.P., Schmelz, H. (1974):
Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets.
Pflügers Arch. 351, 195-206

Meister, A. (1975):

Metabolism of sulfur compounds, metabolic pathways.
ed. D.M. Greenberg, 7, 101-88, New York: academic. 3rd ed.

Meister, A., Fraser, P.E., Tice, S.V. (1954):
Enzymatic desulfuration of ß-mercaptopyruvate to pyruvate.
J. Biol. Chem. 206, 561

Meister, A., Tate, S.S. (1976):
Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization.
Annual Rev. Biochem. 45, 559-604

Melien, M.C.M (1984):
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Universität Tübingen

Millard, W.J., Sagar, S.M., Badger, Th.M., Carr, D.B., Arnold, M.A., Spindel, E., Kasting, N.W., Martin, J.B. (1983a):
The effects of cysteamine on thyrotropin and immunoreactive ß-endorphin secretion in the rat.
Endocrinology 112, 518-525

Millard, W.J., Sagar, S.M., Badger, Th.M., Martin, J.B. (1983b):
Cysteamine effects on growth hormone secretion in the male rat.
Endocrinology 112, 509-517

Milner, R.D.G., Hales, C.N. (1967):
The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro.
Diabetologia 3, 47-49

Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R., Brodie, B.B. (1973):
Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 211-217

Modig, H.G., Edgren, M., Revesz, L. (1972):
Release of thiols from cellular mixed disulphides and its possible role in radiation protection.
Int. J. Radiat. Biol. 22, 257-268

Moldeus, P., Ormstad, K., Reed, D.J. (1981):
Turnover of cellular glutathione in isolated rat-kidney cells. Role of Cystine and methionine.
Eur. J. Biochem. 116, 13-16

Montague, W., Cook, J.R. (1971):
The role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in the regulation of insulin release by isolated rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 122, 115-120

Montague, W., Howell, S.L. (1973):
The mode of action of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in mammalian islets of Langerhans.

Biochem. J. 134, 321-327

Montague, W., Howell, S.L., Green, I.C. (1976):
Insulin release and the microtubular system of islets of Langerhans: Effects of insulin secretagogues on microtubule subunit pool size.
Horm. Metab. Res. 8, 166-169

Montague, W., Taylor, K.W. (1969):
Islet-cell metabolism during insulin release.
Biochem. J. 115, 257

Mukherjee, S.P., Lynn, W.S. (1979):
Role of cellular redox state and glutathione in adenylate cyclase activity in rat adipocytes.
Biochim. Biophys. Acta 568, 224-233

Mukherjee, S.P., Mukherjee, C. (1981):
Role of sulfhydryl oxidation in adipocyte plasma membrane surface in the response of adenylate cyclase to isoproterenol and glucagon.
Biochim. Biophys. Acta 677, 339-349

Munthe, E., Guldal, G., Jellum, E. (1979):
Increased intracellular glutathione during penicillamine treatment for rheumatoid arthritis.
Lancet 2, 1126-7

Mustea, I., Uray, Z. (1971):
The effect of some radioprotective substances on the redox-equilibrium in the spleen.
Intern. J. Radiat. Biol. 19, 281

Nagai, S., Black, S. (1968):
A thiol-disulfide transhydrogenase from yeast.
J. Biol. Chem. 243, 1942-47

Norfleet, W.T., Pagliari, A.S., Haymond, M.W., Matschinsky, F.M. (1975):
Comparison of alpha- and beta-cell secretory responses in islets isolated with collagenase and in the isolated perfused pancreas in rats.
Diabetes 24, 961-970

Olney, J.W., Ho, O.L., Rhee, V. (1971):
Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system.
Exp. Brain Res. 14, 61-76

Orrenius, S., Jewell, S.A., Belloma, G., Thor, H., Jones, D.P., Smith, M.T. (1983):
Regulation of calcium compartimentation in the hepatocyte - A critical role of glutathione.
in: Functions of glutathione (Nobel Conf.). New York, Raven
Larrson, A., Orrenius, S., Holmgren, A., Mannennik, B., eds., pp. 259-70

Orrenius, S., Jones, D.P. (1978):
Functions of glutathione in drug metabolism.
in: Functions of glutathione in liver and kidney. Proc. Life Sci., Sies, H., Wendel, A. (eds.), Springer-Verlag, S.164

Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M. (1975):
Iodoacetate and iodoacetamide-induced alterations of pancreatic and ß-cell responses.
Endocrinology 97, 698

Panten, U.J., Christians, E., von Kriegstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1973):
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Panten, U., Christians, J., von Kriegstein, E., Poser, W., Hasselblatt, A. (1974):
Studies on the mechanism of L-Leucine - and alpha-Ketoisocaproic acid-induced insulin release from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149-154

Patel, Y.C., Pierzchala, I. (1983):
Depletion of islet somatostatin by cysteamine augments insulin secretion.
Diabetes 32, Suppl.1, 8A, Abstr. 32

Pfeiffer, D.R., Taylor, R.W., Lardy, H.A. (1978):
Ionophore A 23187: Cation binding and transport properties.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 307, 402

Porte, D. (1967):
Beta adrenergic stimulation of insulin release in man.
Diabetes 16, 150-155

Potter, W.Z., Davis, D.C., Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Gillette, J.R., Brodie, B.B. (1973):
Acetaminophen-induced hepatic necrosis. III. Cytochrome P-450-mediated covalent binding in vitro.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 203-210

Prescott, L.F., Park, J., Sutherland, G.R, Smith, I.J., Proudfoot, A.T. (1976):
Cysteamine, methionine, and penicillamine in the treatment of paracetamol poisoning.
Lancet 2, 109

Pressman, B.C. (1976):
Biological applications of ionophores.
Ann. Rev. Biochem. 45, 501

Puri, R.N., Meister, A. (1983):
Transport of glutathione, as gamma-glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5258-5260

Racker, E. (1955):
Glutathione-homocystine transhydrogenase.
J. Biol. Chem. 217, 867-74

Reed, D.J., Beatty, P.W. (1978):
The role of cystathionine pathway in glutathione regulation by isolated hepatocytes.
in: Functions of glutathione in liver and kidney.
Proc. Life Sci., Sies, H., Wendel, A. (eds.), Springer-Verlag pp. 13-21

Reed, P.W., Lardy, H.A. (1972):
A 23187: A divalent cation ionophore.
J. Biol. Chem. 247, 6970

Regen, D.M., Schraw, W.P., Tarpley H.L., Juliao, S.F. (1981):
Effects of thiol reagents on glucose transport in thymocytes.
Biochim. Biophys. Acta 644, 62-68

Revesz, L., Modig, H. (1965):
Cysteamine-induced increase of cellular glutathione level: A new hypothesis of radioprotective mechanism.
Nature (London) 207, 430-431

Richman, P.G., Meister, A. (1975):
Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione.
J. Biol. Chem. 250, 1422-1426

Rink, H. (1974):
Thiol compounds in radiation biology.
In: Flohe, L., Benöhr, H., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. (eds.) Glutathione. Proceedings of the 16 th Conference of the German Society of Biological Chemistry.
Thieme, Stuttgart, p. 206-216

Samols, E., Marri, G., Marks, V. (1965):
Promotion of insulin secretion by glucagon.
Lancet 2, 415-416

Sandoval, I.V., Cuatrecasas P. (1976):
Protein kinase associated with tubulin. Affinity chromatography and properties.
Biochemistry 15, 3424-3432

Sass, M.D., Caruso, C.J., Axelrod, D.R. (1969):
Mechanism of the TPNH-linked reduction of methemoglobin by methylene blue.
Clin. Chim. Acta 24, 77-85

Schubart, U.K., Erlichmann, J., Fleischer, N. (1980):
The role of calmodulin in the regulation of protein phosphorylation in insulin release in hamster insulinoma cells.
J. Biol. Chem. 225, 4120-4124

Sehlin, J. (1976):
Calcium uptake by subcellular fractions of pancreatic islets. Effects of nucleotides and theophylline.
Biochem. J. 156, 63-69

Sehlin, J., Täljedal, J.-B. (1974a):
Sodium uptake by microdissected pancreatic islets: effect of ouabain and chloromercuribenzene-p-sulphonic acid.
FEBS Lett. 39, 209-213

Sehlin, J., Täljedal, J.-B. (1974b):
Transport of rubidium and sodium in pancreatic islets.
J. Physiol. Lond. 242, 505-515

Sehlin, J., Täljedal, J.-B. (1975):
Glucose-induced decrease in Rb(+) permeability in pancreatic beta-cells.
Nature London 253, 635-636

Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH4(+) in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Sharp, G.W.G., Wiedenkeller, D.E., Kaelin, D., Siegel, E.G., Wollheim, R.C. (1980):
Stimulation of adenylate cyclase by Ca(2+) and calmodulin in rat islets of Langerhans. Explanation for the glucose-induced increase in cAMP levels.
Diabetes 29, 74-77

Sies, H., Gerstenecker, C., Menzel, H., Flohe, L. (1972):
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171-175

Sies, H., Graf, P., Estrela, J.M. (1981):
Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmatic reticulum in intact liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3358-62

Smith, P.H., Porte, D. (1976):
Neuropharmacology of the pancreatic islets.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 269-285

Sodoyez, J.-C., Sodoyez-Goffaux, F., Foa, P.P. (1969):
Feedback regulation of insulin secretion by insulin: role of 3', 5'-cyclic AMP.
in: Falkmer, Hellman, Täljedal: The structure and metabolism of pancreatic islets. p. 445

Soeldner, J.S., Slone, D. (1965):
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin

using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771-779

Somers, G., Blondel, B., Orci, L., Malaisse, W.J. (1979):
Motile events in pancreatic endocrine cells.
Endocrinology 104, 255

Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J. (1976):
Analogy between native and exogenous ionophores in the pancreatic B-cell.
Febs. Lett. 66, 20-22

Sorenson, R.L., Grouse, L.H., Elde, R.P. (1983):
Cysteamine blocks somatostatin secretion without altering the course of insulin or glucagon release. A new model for the study of islets function.
Diabetes 32, 377-379

Srivastava, S.K., Awashti, Y.C., Beutler, E. (1974):
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes - Organic hydroperoxides.
Biochem. J. 139, 289-295

Stork, H., Schmidt, F.H., Westman, S., Hellerström, C. (1969):
Action of some hypoglycaemic sulphonylureas on the oxygen consumption of isolated pancreatic islets of mice.
Diabetologia 5, 279-283

Storm, D.R., Dolginow, Y.D. (1973):
Glucagon stimulation of adenylate cyclase sulfhydryl reactivity. Evidence for hormone-induced conformational changes.
J. Biol. Chem. 248, 5208-5210

Sugden, M.C., Ashcroft, S.H.J. (1977):
Phosphoenolpyruvate in rat pancreatic islets: a possible intracellular trigger of insulin release.
Diabetologia 13, 481-486

Sugden, M.C., Ashcroft, S.H.J. (1978):
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-180

Sugden, M.C., Christie, M.R., Ashcroft, S.H.J. (1979):
Presence and possible role of calcium-dependent regulator (calmodulin) in rat islets of Langerhans.
FEBS Lett. 105, 95-100

Szabo, S., Reichlin, S. (1981):
Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration.
Endocrinology 109, 2255-2257

Szabo, S., Trier, J.S., Frankel, P.W. (1981):
Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection.

Science 214, 4517

Tateishi, N., Higashi, T. (1978):
Turnover of glutathione in rat liver.
in: Functions of glutathione in liver and kidney. Proc. Life Sci., Sies, H., Wendel, A. (eds.), Springer-Verlag

Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., Sakamoto, Y. (1974):
Studies on the regulation of glutathione level in rat liver.
J. Biochem. 75, 93

Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Nakashima, K., Shiozaki, H., Sakomoto, Y. (1977):
Rat liver glutathione: Possible role as a reservoir of cysteine.
J. Nutr. 107, 51

Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., Hikita, K., Sakamoto, Y. (1981):
Relative contributions of sulfur atoms of dietary cysteine and methionine to rat liver glutathione and proteins.
J. Biochem. 90, 1603-1610

Thompson, G.A., Meister, A. (1975):
Utilization of L-cystine by the gamma-glutamyl transpeptidase-gamma-glutamyl cyclotransferase pathway.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1985-88

Thor, H., Moldeus, P., Orrenius, S. (1979):
Metabolic activation and hepatotoxizity. Effect of cysteine, N-acetylcysteine and methionine on glutathione biosyntesis and bromobenzene toxizity in isolated rat hepatocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 192, 405-413

Turtle, J.R., Kipnis, D.M. (1967):
An adrenergic receptor mechanism for the control of cyclic 3',5' adenosine monophosphate synthesis in tissues.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 797-802

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972):
Manometric and biochemical techniques.
5 th edition, Burgess Publ. Co., Minneapolis, USA, S. 146

Valverde, I.A., Vandermeers, R., Anjaneyulu, R., Malaisse, W.J. (1979):
Calmodulin activation of adenylate cyclase in pancreatic islets.
Science 206, 2225-2237

Vance, J.E., Buchanan, K.D., Williams, R.H.:
Glucagon and insulin release. Influence of drugs affecting the autonomic nervous system.
Diabetes 20, 78-82

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979):
Pentosephosphat shunt activity of rat pancreatic islets: its dependence on glucose concentration.

Endocrinology 105, 1269-1274

Viña, J., Estrela, J.M., Guerri, C., Romero, J. (1980):
Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes.
Biochem. J. 188, 549-552

Wahl, M. (1983):
Dissertation
Fakultät für Chemie und Pharmazie,
Universität Tübingen

Weiss, B., Prozialeck, W., Cimino, M., Sellinger Barnette M., Wallace, T.L. (1980):
In: Calmodulin and cell function.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 356, 319-345

Wendel, A., Feuerstein, S. (1981):
Drug-induced lipid peroxidation in mice -I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status.
Biochem. Pharmacol. 30, 2513-2520

Wendel, A., Jaeschke, H. (1982):
Drug-induced lipid peroxidation in mice -II. Protection against paracetamol-induced liver necrosis by intravenous liposomally entrapped glutathione.
Biochem. Pharmacol. 31, 3601-3605

Williamson, J.M., Meister, A. (1982):
New substrates of 5-Oxo-L-prolinase.
J. Biol. Chem. 257, 12039-12042

Wollheim, C.B., Sharp, G.W.G. (1978):
Stimulatory and inhibitory effects of epinephrine on islets Ca(2+) uptake and insulin release.
Diabetologia 15, 282

Yagi, K., Yazawa, M., Kakiuchi, S., Ohshima, M., Uenishi, K. (1978):
Identification of an activator protein for myosin light chain kinase as the Ca(2+)-dependent modulator protein.
J. Biol. Chem. 253, 1338-1341

Yamaguchi, K., Shigehisa, S., Sakakibara, S., Hosokawa, Y., Ueda, I. (1975):
Cysteine metabolism in vivo of viamin B6-deficient rats.
Biochim. Biophys. Acta 381, 1

Yamazaki, S., Katada, T., Ui, M. (1982):
Alpha2-adrenergic inhibition of insulin secretion via interference with cyclic AMP generation in rat pancreatic islets.
Molecul. Pharmacol. 21, 648-653

Zawalich, W.S., Pagliari, A.S., Matschinski, F.M. (1977):
Effect of iodoacetat, mannoheptulose and 3-O-methyl glucose on the secretory function and metabolism of isolated pancreatic islets.

Endocrinology 100, 1276-1283

Zielmann, S., Panten, U. (1983):
Effects of isoprenaline on insulin release from isolated mouse pancreatic islets.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 322, Abstract No. 219

LEBENSLAUF

Gabriele Enz

geboren am 26.November 1956 in Illertissen

Eltern: Albrecht Enz, Textiltechniker
Berta Enz, geb. Hakspiel

1964 Grundschule in Dietenheim, von April 1964 bis Juli 1967

1967 Besuch des Kath. Mädchengymnasiums St. Hildegard in Ulm/Do.

1976 Reifeprüfung im Mai 1976

1976 Studium der Pharmazie an der Karl-Eberhard Universität in Tübingen

1978 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 7. Sept.

1980 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 19. März

1980 Pharmaziepraktikum in der Mörike-Apotheke in Plattenhardt/Fildern von April 1980 bis April 1981

1981 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung am 30. April

1981 Approbation als Apotheker am 13. Mai 1981

1981 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut in Tübingen im Mai,
seit Juli 1981 wissenschaftl. Hilfskraft an diesem Lehrstuhl

1983 Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation im November

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren

H. Auterhoff, K.-A. Kovar, J. Schultz (Pharmazeutische Chemie); E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie); E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie); E. Lindner (anorgan. Chemie); E. Bayer (organ. Chemie); K. Botzenhart (Medizinische Mikrobiologie); H. Seiler (Physik)